

METANEFRIE TOTALI FRAZIONATE URINARIE – FAST - Codice Z13210 **(FLUORIMETRIA)**

BIOCHIMICA

Le catecolamine sono composti organici diidrossilati caratterizzati da un anello fenolico di tipo catecolico (diidrossibenzene).

I membri più importanti di questa famiglia sono: **ADRENALINA, NORADRENALINA, DOPAMINA**. La sintesi delle catecolamine avviene attraverso una serie di reazioni enzimatiche che utilizzano come substrato iniziale l'aminoacido aromatico **L-TIROSINA** (fig. 1) e tale formazione ha luogo nelle cellule cromaffini della midollare surrenale e dei neuroni simpatici.

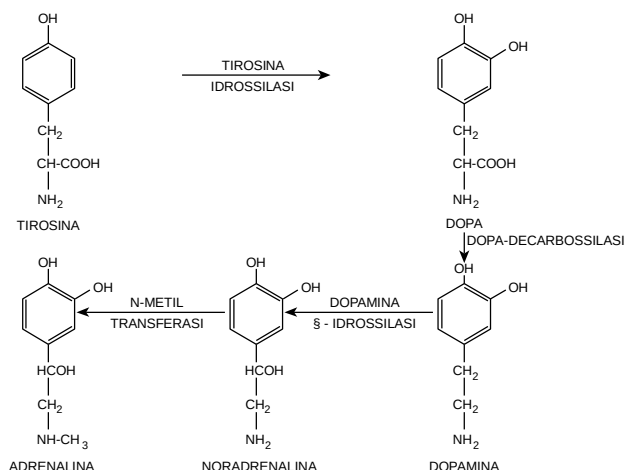


Figura 1: Biosintesi delle catecolamine

CATABOLISMO

Il catabolismo delle monoamine è in parte neuronale ed avviene nei mitocondri ad opera delle **MonoAminoOssidasi (MAO)** e in parte extraneuronale per le catecolamine, ad opera della **CatecolaminaOrtoMetiltransferasi (COMT)**.

In particolare:

- dalla **DOPAMINA** per azione delle MAO si ha l'**Acido Diidrossifenilacetico (DOPAC)** il quale per azione della COMT viene trasformato in **Acido OMOVANILLICO (HVA)**.
- dalla **NORADRENALINA** e dall'**ADRENALINA** si origina invece per azione delle MAO, l'**aldeide 3,4-Diidrossimandelica** da cui derivano successivamente il **3,4-Diidrossifenilglicole (DHPG)** e il **3-Metossi-4-Idrossifenilglicole (MHPG)**.
- Esiste alternativamente un'altra via metabolica che le trasforma in l'**Acido 3,4-Diidrossimandelico** da cui per azione della COMT si ha la sintesi di **Acido Vanilmandelico (VMA)**.

L'**Acido Omovanillico** è il principale catabolita della **DOPAMINA** mentre l'**Acido Vanilmandelico** rappresenta il principale catabolita di **NORADRENALINA** e di **ADRENALINA**. (fig. 2)

EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

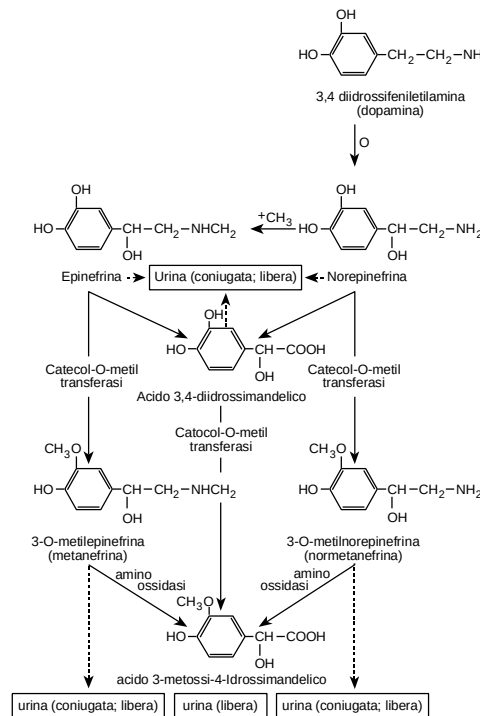


Figura 2: Metabolismo degli omoni della midollare del surrene

PATOLOGIA

La patologia specifica è rappresentata da: **FEOCROMOCITOMA, PARAGANGLIOMA, NEUROBLASTOMA**.

Il **FEOCROMOCITOMA** è un tumore che spesso si manifesta in soggetti caratterizzati da forte ipertensione (1/1000 soggetti ipertesi), di non elevata malignità (< 5%) e si riscontra nel 90% dei casi in sede surrenalica e nel 10% in sede extrasurrenalica dove prende il nome di **PARAGANGLIOMA**.

Le sedi extrasurrenaliche più frequenti sono l'organo di Zuckerkandle, gli altri paragangli addominali e la vescica. Può essere unico nel 90% dei casi e multiplo nel 10%; inoltre nel 90% dei casi è di tipo occasionale e su base familiare nel restante 10%. Talvolta coinvolge entrambe le surreni (bilaterale) e spesso è associato a carcinoma midollare tiroideo (adenomatosi endocrina multipla di tipo II). La malignità si riscontra nel 10% dei casi.

Il **NEUROBLASTOMA** deriva dai simpatogoni provenienti dalla cresta neurale, dopo trasformazione in neuroblasti. Si tratta di tumori immaturi e maligni, localizzati nella midollare o nei gangli simpatici. Producono Catecolamine e loro metaboliti; caratteristicamente si rileva un aumento di **DOPAMINA** e naturalmente di **Acido Omovanillico**. Mentre il sospetto clinico è soprattutto anamnestico, la conferma è solo laboratoristica, mediante l'accertamento di aumentati livelli di catecolamine e/o dei loro metaboliti nel plasma e/o nelle urine. La determinazione delle Catecolamine nel plasma assume particolare rilevanza sul prelievo effettuato in corso di crisi.

CHIMICA E DOSAGGIO MEDIANTE TECNICA HPLC

Le Metanefrine (**NORMETANEFRINA** e **METANEFRINA**), intermedi del metabolismo delle Catecolamine, vengono purificate su colonne di Clean-up e quindi estratte; la soluzione ottenuta viene derivatizzata e iniettata in HPLC

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo :

Le Metanefrine (NORMETANEFrina, METANEFrina e 3-METOSSITIRAMINA), dopo purificazione su colonne di Clean-up, vengono estratte e, dopo derivatizzazione, la soluzione viene iniettata in HPLC.

Recupero del Metodo :

> 98 %

Sensibilità analitica (LLOD) :

1,5 µg/l per ogni Analita

Linearità del Metodo :

5 - 8.000 µg/l per ogni Analita

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) :

5 µg/l per ogni Analita

Valori di Normalità nelle Urine delle 24 h :

NORMETANEFrina	88 – 444	µg/24 h
METANEFrina	52 – 341	µg/24 h
3-METOSSITIRAMINA	55 – 247	µg/24 h

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Metanefrina :

Ci	Cs
40 µg/l	300 µg/l
8,61%	6,68%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Metanefrina :

Ci	Cs
40 µg/l	300 µg/l
6,08%	4,68%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Metanefrina :

C LLOQ	Cm	Cs
5 µg/l	100 µg/l	600 µg/l
9,27%	3,97%	2,43%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Metanefrina:

C LLOQ	Cm	Cs
5 µg/l	100 µg/l	600 µg/l
9,98%	4,96%	2,58%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev Std :

Metanefrina 0,9995 ± 0,0003

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Normetanefrina :

Ci	Cs
40 µg/l	300 µg/l
6,14%	3,75%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Normetanefrina :

Ci	Cs
40 µg/l	300 µg/l
6,70%	3,15%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Normetanefrina :

C LLOQ	Cm	Cs
5 µg/l	100 µg/l	600 µg/l
13,84%	3,01%	2,41%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Normetanefrina:

C LLOQ	Cm	Cs
5 µg/l	100 µg/l	600 µg/l
11,24%	5,16%	1,80%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev Std :

Normetanefrina 0,9991 ± 0,0008

Accuratezza intra serie (errore relativo %) 3-Metossitiramina :

Ci	Cs
40 µg/l	300 µg/l
5,16%	2,46%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) 3-Metossitiramina :

Ci	Cs
40 µg/l	300 µg/l
6,83%	3,30%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) 3-Metossitiramina :

C LLOQ	Cm	Cs
5 µg/l	100 µg/l	600 µg/l
12,63%	4,99%	2,08%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) 3-Metossitiramina :

C LLOQ	Cm	Cs
5 µg/l	100 µg/l	600 µg/l
11,55%	3,78%	3,53%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev Std :

3-Metossitiramina 0,9983 ± 0,0017

Contenuto della confezione :

Reagente A – Soluzione di Condizionamento 1, **1 x 120 ml**

Reagente B – Soluzione di Condizionamento 2, **1 x 110 ml**

Reagente C – Soluzione di Condizionamento 3, **1 x 120 ml**

Reagente D – Soluzione di Diluizione, **1 x 120 ml**

Reagente E – Soluzione di Lavaggio 1, **1 x 120 ml**

Reagente N – Soluzione di Lavaggio 2, **1 x 220 ml**

Reagente F – Soluzione di Eluizione, **1 x 80 ml**

Reagente G – Soluzione Test, **1 x 5 ml**

Reagente H – Soluzione Standard interno, **1 x 5 ml**

Reagente I – Soluzione per Idrolisi, **1 x 10 ml**

Reagente K – Soluzione Tampone, **1 x 50 ml**

Reagente J – Soluzione Derivatizzante, **1 x 10 ml**

Reagente L – Soluzione Starter, **1 x 10 ml**

Reagente P – Soluzione Indicatore, **1 x 1 ml**

Reagente Q – Soluzione Stabilizzante, **1 x 10 ml**

Reagente M – Fase Mobile, **5 x 500 ml**

Calibratore Urinario Liofilo, **2 x 5 ml**

Colonne Clean-up, **100 pz**

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura ambiente (≤ 20 °C) eccetto gli Standard di Calibrazione liofilo e la Soluzione Test.

Stoccare a 2-8 °C

Da diluire 1:10 prima dell'uso con Acqua di grado HPLC

Confezionato a parte

Codice Z12516

Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 20 µl
Detector Fluorimetrico λ_{EX}=275 λ_{EM}=325
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Preparatore automatico del campione

Modalità di raccolta delle Urine delle 24 h e
conservazione del Campione Urinario:

Prima di iniziare la raccolta versare nel recipiente circa 5 ml di HCl 5 M per ogni litro di Urina che presumibilmente verrà emessa. Per la raccolta di una persona adulta occorreranno circa 10 ml. Per la raccolta di un bambino occorreranno circa 5 ml. Un campione di circa 10 ml di urina delle 24 h va prelevato ed inviato al Laboratorio con l'indicazione della diuresi totale. Controllare che le urine pervenute abbiano un pH tra 2,0 e 4,0. ***Se il pH è > di 7 il campione potrebbe non essere idoneo per il test.*** Congelare il campione a – 20 °C se l'analisi deve essere differita. Stabile oltre 2 mesi.

PROCEDURA PREANALITICA

In una provetta pipettare:

- 100 µl di **Reagente G – Soluzione Test**
- 100 µl di Acqua grado HPLC

INIEZIONE:

- Iniettare 20 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

Verificare che la Sol. Test abbia tempi di ritenzione simili a quelli riportati in fig. 3. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico. ***Importante*** : Questa Soluzione così ottenuta non deve essere usata come calibratore

PROCEDURA ANALITICA

IDROLISI DEL CAMPIONE

1. In provette pyrex da 10 ml con tappo in teflon trasferire:
 - 1 ml di Campione Urinario o Calibratore Urinario ricostituito o Controllo Urinario normale o Controllo Urinario patologico
 - 50 µl di **Reagente H - Soluzione Standard interno diluito 1:10 con Acqua grado HPLC**
2. Aggiungere a tutti 500 µl di Acqua di grado HPLC
3. Aggiungere 100 µl di **Reagente I – Reagente per Idrolisi**
4. Chiudere ermeticamente le provette con il tappo e assicurarsi della tenuta.
5. Porre in stufa a 90 °C per 30 minuti
6. Lasciar raffreddare; quindi aggiungere 10 µl di **Reagente P – Soluzione Indicatore**
7. Aggiungere 100 µl di **Reagente Q – Soluzione Stabilizzante**
8. Aggiungere 500 µl di **Reagente K – Soluzione Tampone**

Verificare che la soluzione viri ad un colore blu/verde.

Nel caso in cui ciò non si verificasse, accertarsi che il pH della soluzione abbia raggiunto un valore tra **4.5 e 6.0**; nel caso in cui il pH non abbia raggiunto il valore del range aggiustarlo con NaOH 2M o HCl 1M.

PURIFICAZIONE DEI CAMPIONI, DELLO STANDARD E DEI CONTROLLI

FASE 1: In una provetta di plastica diluire gli Standard, i Campioni e i Controlli secondo il seguente schema:

	Calibratore	Campioni	Controlli
Reagente D – Soluzione Diluente	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Calibratore Urinario Idrolizzato	1000 µl	/	/
Campione Urinario Idrolizzato	/	1000 µl	/
Controllo Urinario Idrolizzato	/	/	1000 µl

FASE 2: Preparazione delle Colonne Clean-up

7

NORMETANEFRINA	circa 1300 µg/l
METANEFRINA	circa 700 µg/l
3-METOSSITIRAMINA	circa 160 µg/l

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO

LUNGHEZZA D'ONDA DI ECCITAZIONE	275 nm
LUNGHEZZA D'ONDA DI EMISSIONE	325 nm
SENSIBILITA' STRUMENTALE	MEDIUM o HIGH
TEMPO DI INTEGRAZIONE	4 o 5

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare colonna analitica POROSHELL PFP (100 x 4,6 mm – 2,7 µ) è tassativo l'uso dei Prefiltri Javelin (1 x 10 pz), cod. S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica <u>nuova</u> Reverse Phase POROSHELL PFP (100 x 4,6 mm – 2,7 µ). Disconnettere il detector Fluorimetrico e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v / v) al flusso di 1,0 ml/minuto. Non riciclare i liquidi di lavaggio. Far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Acetonitrile (80 : 20 v / v) al flusso di 1,0 ml/minuto. Non riciclare i liquidi di lavaggio. Per ottenere tempi di corsa più brevi è opzionale la termostatazione della colonna a 45°C. Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1 ml/minuto e scaricare i primi 60 ml. Al termine, iniettare il test chimico e verificare la congruità della separazione. Non è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase. Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.
--

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Girare al contrario la colonna e far fluire 15 ml di H₂O : Acetonitrile (80 : 20 v / v) al flusso di 1,0 ml/minuto e scaricare. Fluire una soluzione di H₂O : Acetonitrile (30 : 70 v / v) per 30 minuti scaricandola. Si raccomanda di eseguire il lavaggio della Colonna Analitica alla fine di ogni seduta analitica. La colonna va stoccata in una soluzione di H₂O : Acetonitrile (30 : 70 v / v)

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

Acqua / Etanolo o Metanolo o Acetonitrile (80 : 20 v/v).
--

PARAMETRI HPLC

LOOP	20 µl
Flusso di lavoro consigliato	0,9 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 189 bar
Termostatazione colonna	45°C

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z12516	Calibratore urinario per Metanefrine	4 x 5 ml
Z10559	Controllo urinario per Amine Biogeniche - Livello 1 e 2	2 x 5 x 5 ml
Z695975408	Colonna Analitica Poroshell 120, PFP (100 x 4,6 mm - 2,7 µm)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 PZ

METANEFRINE TOTALI URINARIE FAST (Cromatogrammi di Riferimento)

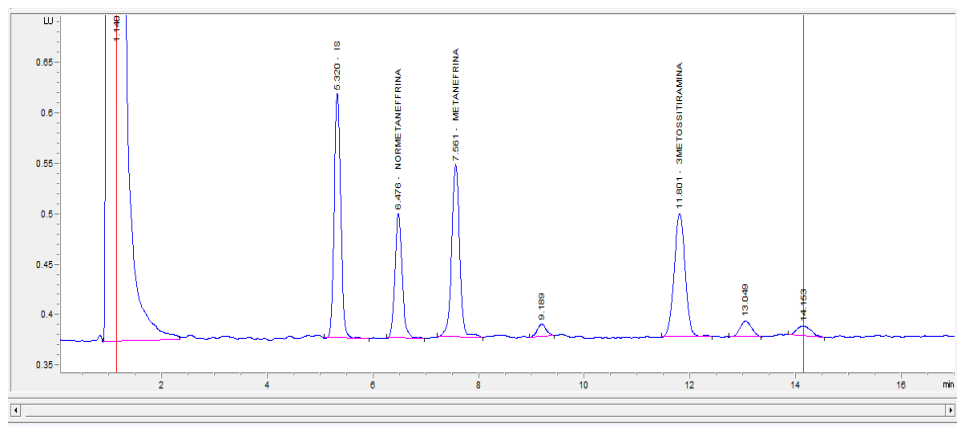


Fig. 1:	Calibratore urinario		
	R.T. 5.32	Standard interno	
	R.T. 6.47	Normetanefrina	422,3 µg/l
	R.T. 7.51	Metanefrina	372,7 µg/l
	R.T. 11.80	3-Metossitiramina	218,1 µg/l

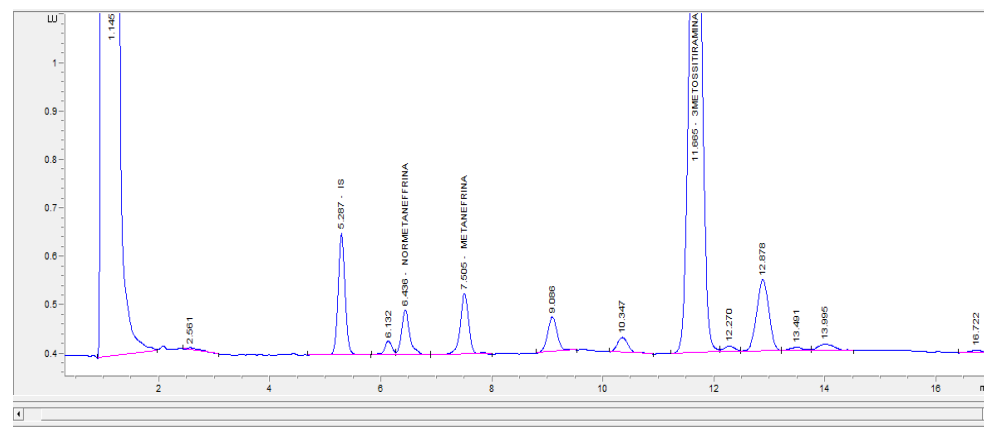


Fig. 2:	Campione urinario		
	R.T. 5.28	Standard interno	
	R.T. 6.43	Normetanefrina	
	R.T. 7.50	Metanefrina	
	R.T. 11.66	3-Metossitiramina	

METANEFRINE TOTALI URINARIE FAST (Cromatogrammi di Riferimento)

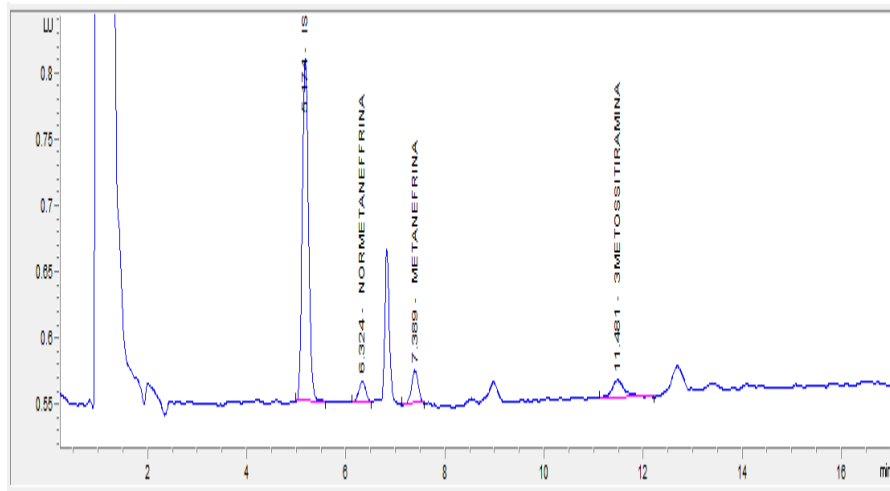


Fig. 3:	Controllo basso urinario		
	R.T. 5.17	Standard interno	
	R.T. 6.32	Normetanefrina	57,0 µg/l
	R.T. 7.38	Metanefrina	42,0 µg/l
	R.T. 11.48	3-Metossitiramina	29,0 µg/l

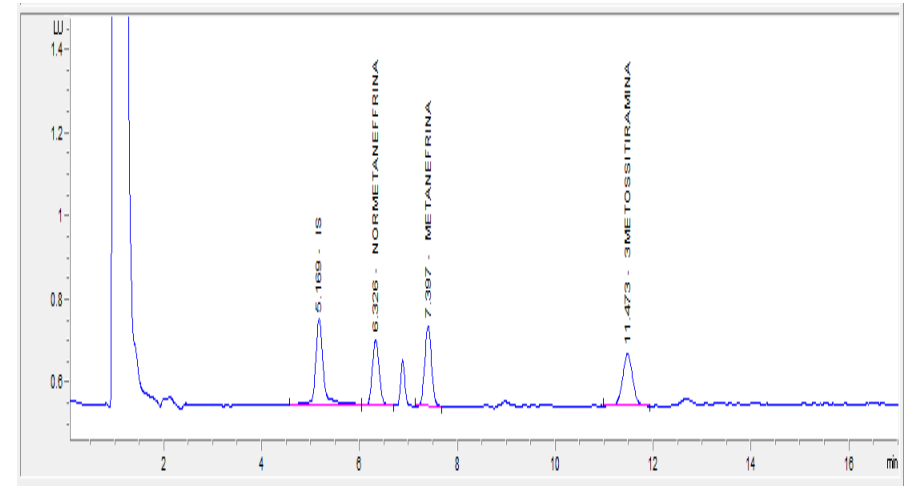


Fig. 4:	Controllo alto urinario		
	R.T. 5.18	Standard interno	
	R.T. 6.32	Normetanefrina	809,0 µg/l
	R.T. 7.39	Metanefrina	684,0 µg/l
	R.T. 11.47	3-Metossitiramina	412,0 µg/l