

CATECOLAMINE LIBERE PLASMATICHE FAST –

Codice Z25610

(in 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.

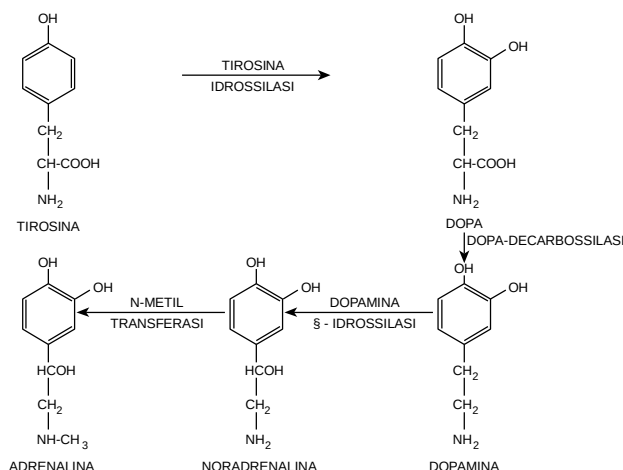


Figura 1: Biosintesi delle catecolamine

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 **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



CE

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.

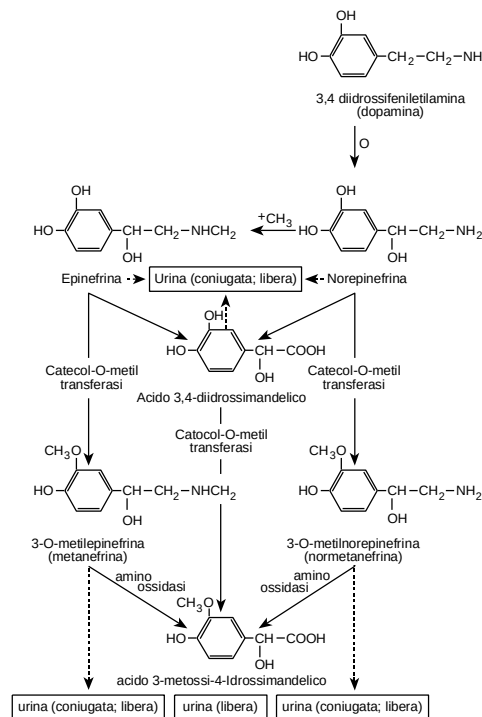


Figura 2: Metabolismo degli omoni della midollare del surrene

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

Il presente metodo consente di analizzare le Catecolamine libere Plasmatiche con procedura di Clean-up e successiva derivatizzazione per analisi in Fluorimetria. Dopo derivatizzazione 100 µl della soluzione vengono iniettati nel sistema HPLC e letti in fluorimetria.

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo :

Le Catecolamine (NORADRENALINA – ADRENALINA – DOPAMINA), dopo purificazione su colonne di Clean-up, vengono derivatizzate con due reagenti specifici e incubate a 70 °C per 15 minuti. La soluzione derivatizzata, viene iniettata in HPLC.

Recupero del Metodo :

> 98 %

Sensibilità del Metodo :

< 10 pg/ml per Noradrenalina
< 8 pg/ml per Adrenalina
< 18 pg/ml per Dopamina

Linearità del Metodo :

> 80.000 pg/ml per ogni Analita

Valori di Normalità nel Plasma, a riposo:

NOREPINEFRINA

Supino 70-750 pg/ml

In piedi: 200-1.700 pg/ml

EPINEFRINA

Supino: < o =111 pg/ml

In piedi: < o =141 pg/ml

DOPAMINA

<30 pg/ml (indifferentemente dalla postura)

Ref. www.mayocliniclabs.com

Contenuto della Confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura ambiente (≤ 20 °C), eccetto lo Standard Liofilo di calibrazione, la scadenza del quale e le modalità di conservazione sono descritti nelle Avvertenze, lo Standard interno e la Soluzione Test che devono essere conservati a 2-8 °C.

Reagente A – Soluzione di Condizionamento 1, 1 x 100 ml

Reagente B – Soluzione di Condizionamento 2, 1 x 100 ml

Reagente C – Soluzione di Condizionamento 3, 1 x 100 ml

Reagente D – Soluzione di Diluizione, 1 x 200 ml

Reagente E – Soluzione di Lavaggio, 1 x 200 ml

Reagente F – Soluzione di Eluizione, 1 x 50 ml

Reagente G – Soluzione Test, 1 x 5 ml

Reagente I – Soluzione Standard Interno, 1 x 10 ml

Conservare a 2-8 °C

Conservare a 2-8 °C

Da diluire 1:10 prima dell'uso

Reagente J – Soluzione Derivatizzante, 1 x 2 ml

Reagente L – Soluzione Starter, 1 x 2 ml

Reagente M – Fase Mobile, 4 x 500 ml

Calibratore Liofilo, 5 x 1 ml

Codice Z25016

Confezionato a parte – vedi scheda tecnica

Colonne di Clean-up – 100 pz

Modalità di esecuzione del prelievo ematico e conservazione del Campione plasmatico:

Stabilizzare il paziente per almeno 10 minuti sulla poltrona di prelievo. Preparare in un piccolo beaker un bagno di acqua/ghiaccio. Prelevare 4 ml di sangue venoso in una provetta contenente EDTA come anticoagulante. Agitare delicatamente per inversione per circa 1 minuto il campione prelevato e porre velocemente la provetta nel bagno di acqua/ghiaccio precedentemente preparato. Centrifugare subito dopo a 3.000 rpm per 3 minuti.

Prelevare circa 1,5 ml di Plasma. Se non si analizza subito, stoccare il campione in congelatore a – 70 °C dove è stabile circa 1 mese.

PROCEDURA PREANALITICA

FASE 1: In una provetta di vetro o plastica da 1,5 ml con tappo di chiusura pipettare:

- 200 µl di **Reagente F** – Sol. Eluente
- 20 µl di **Reagente G** – Sol. Test
- 20 µl di **Reagente I** – Standard Interno (diluito 1:10 con Acqua grado HPLC)
- 20 µl di **Reagente J** – Sol. Derivatizzante
- 20 µl di **Reagente L** – Sol. Starter

FASE 2: Chiudere la provetta.

- Incubare a 70 °C per 15 minuti

Raffreddare

FASE 3:

- Aggiungere 200 µl di Acqua di grado HPLC

Agitare al vortex per 5 secondi

INIEZIONE :

- Iniettare 50 µl della soluzione nel sistema 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 : Questo Test non deve essere usato come calibratore

CONDIZIONAMENTO E ATTIVAZIONE DELLE COLONNE DI CLEAN-UP

Porre le colonne di Clean-up in provette di plastica da 10 ml in modo da raccogliere gli eluati da scartare.

1 Versare nelle colonne 1,0 ml di Reagente A – Soluzione di Condizionamento 1

Fare percolare la soluzione attraverso la colonna al flusso di 1,0 ml/minuto (goccia a goccia) anche con l'ausilio di un vuoto moderato

Scartare l'eluato

2 Versare nelle colonne 1,0 ml di Reagente B – Soluzione di Condizionamento 2

Fare percolare la soluzione attraverso la colonna al flusso di 1,0 ml/minuto (goccia a goccia) anche con l'ausilio di un vuoto moderato

Scartare l'eluato

3 Versare nelle colonne 1,0 ml di Reagente C – Soluzione di Condizionamento 3

Fare percolare la soluzione attraverso la colonna al flusso di 1,0 ml/minuto (goccia a goccia) anche con l'ausilio di un vuoto moderato

Scartare l'eluato

A questo punto le colonne di Clean-up sono condizionate ed attivate e sono pronte per la procedura di Purificazione delle Catecolamine Plasmatiche.

PROCEDURA ANALITICA

Purificazione dei Campioni, del Calibratore Liofilo ricostituito e degli eventuali Controlli.

FASE 1 : Preparazione dei Campioni , del Calibratore Plasmatico e degli eventuali Controlli.

- In una provetta di plastica da 10 ml diluire gli Standard, i Campioni e i Controlli secondo il seguente schema:

	Calibratore	Campioni	Controlli
Reagente D – Soluzione Diluente	1400 µl	1400 µl	1400 µl
Calibratore Liofilo ricostituito	600 µl	/	/
Campione	/	600 µl	/
Controllo	/	/	600 µl
Reagente I – Standard Interno (diluito 1:10 con Acqua grado HPLC)	100 µl	100 µl	100 µl

Al vortex per 5 secondi

FASE 2 : Caricamento del Calibratore, dei Campioni e dei Controlli nelle colonne di Clean-up.

- Pipettare nelle rispettive colonne di Clean-up, mediante due aggiunte successive da 1 ml ognuna, il Calibratore, i Campioni ed i Controlli precedentemente preparati.
- Lasciar percolare lentamente al flusso di **circa 1,0 ml/minuto** tutto il liquido di ogni Colonna Clean-up, anche con l'ausilio di un vuoto moderato.

Gettare il liquido percolato

FASE 3 : Pulizia dei campioni caricati nelle colonne Clean-up

Pipettare nelle colonne Clean-up in sequenza:

- 1,0 ml di **Reagente E – Sol. di lavaggio**

Gettare il liquido percolato

Quando tutto il liquido è percolato versare di nuovo:

- 1,0 ml di **Reagente E – Sol. di lavaggio**

Gettare il liquido percolato

Portare a secco con un leggero flusso di aria!

FASE 4 : Eluizione delle Catecolamine dalle colonne Clean-up

Porre le colonne Clean-up in provette di raccolta pulite. Pipettare nelle colonne Clean-up:

- 400 µl di **Reagente F – Sol. eluente** e raccogliere l'eluato.

Avvertenza! Eluire lentamente per circa 1 minuto!

Agitare l'eluato al vortex per 5 secondi

FASE 5 : Procedura di derivatizzazione

Pipettare in una provetta di vetro o di plastica da 1,5 ml con tappo di chiusura:

- 400 µl di **ELUATO** proveniente dalla procedura di purificazione
- 20 µl di **Reagente J – Derivatizzante**
- 20 µl di **Reagente L – Starter**

FASE 6 : Incubare a 70 °C per 15 minuti.

Lasciar raffreddare

N.B.: il campione così preparato è stabile 7 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 50 µl della soluzione derivatizzata nell'HPLC e attendere la stampa del cromatogramma.

CATECOLAMINE PLASMATICHE FAST - Avvertenze

REAGENTE G : SOLUZIONE TEST

NOREPINEFRINA	81,35 µg/l
EPINEFRINA	31,92 µg/l
DOPAMINA	370,23 µg/l

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO (Es.: Fluorimetro Jasco 821 FP)

λ di ECCITAZIONE	360 nm
λ di EMISSIONE	490 nm
GAIN	1 x 100
TEMPO DI INTEGRAZIONE	5 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare il sistema completo POROSHELL 120 EC-C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 µ) è tassativo l'uso del Prefiltri Javelin (1 x 10 pz), cod. S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova POROSHELL 120 EC-C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 µ).
Disconnettere il detector Fluorimetrico e far passare 30 ml di una soluzione di **H₂O : Metanolo (20 : 80 v / v) a pH acidulo (> 3)** e successivamente 30 ml di **H₂O : Metanolo (80 : 20 v / v)**, al flusso di 1,5 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1,5 ml/minuto e scaricare i primi 15 ml. Condizionare ulteriormente la colonna per 15 minuti anche a ricircolo di fase. Al termine, iniettare il test chimico e verificare la congruità della separazione. **NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.**
Il segnale che la fase mobile deve essere cambiata è dato dal significativo innalzamento del rumore di fondo del detector Fluorimetrico.
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. Flussare 30 ml di H₂O : Metanolo o Acetonitrile (80 : 20 v / v) e scaricare. Flussare una soluzione di H₂O : Metanolo o Acetonitrile (30 : 70 v / v) per 30 minuti scaricandola. Quando la colonna verrà usata di nuovo, far passare 15 ml di H₂O : Metanolo (20 : 80 v / v) prima di condizionala con la Fase Mobile. **Si raccomanda di eseguire il lavaggio della Colonna Analitica alla fine di ogni seduta analitica.**

PARAMETRI HPLC

LOOP	50 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,0 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 110 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z25016	Calibratore liofilo in plasma per Catecolamine	4 x 1 ml
Z25019	Controllo liofilo in plasma per Catecolamine, Livelli 1 e 2	2 x 5 x 1 ml
Z25611	Fase Mobile	4 x 500 ml
Z699975902	Colonna Analitica Poroshell 120, EC-C18 (50 x 4,6 mm - 2,7 µm)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
Z51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 µl	1 x 100 PZ
Z51820717	Tappi per vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 µl	1 x 100 PZ



CATECOLAMINE PLASMATICHE IN FLUORIMETRIA FAST (Cromatogrammi di Riferimento)

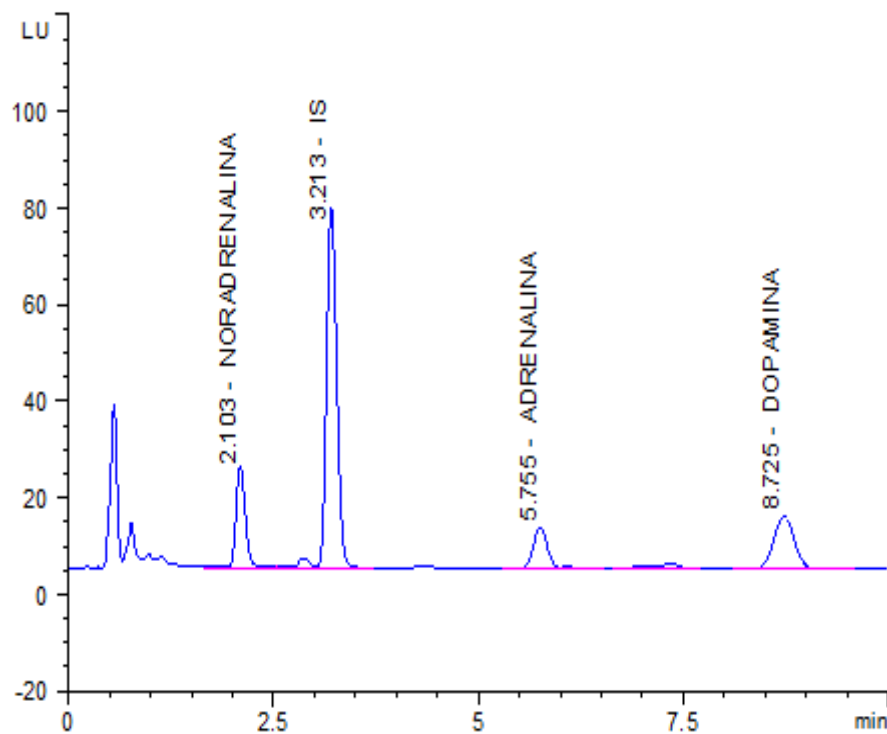


Fig. 3:	Calibratore liofilo plasmatico		
	R.T.	2.10	Noradrenalina 832 ng/l
	R.T.	3.21	Standard interno
	R.T.	5.75	Adrenalina 185 ng/l
	R.T.	8.72	Dopamina 726 ng/l

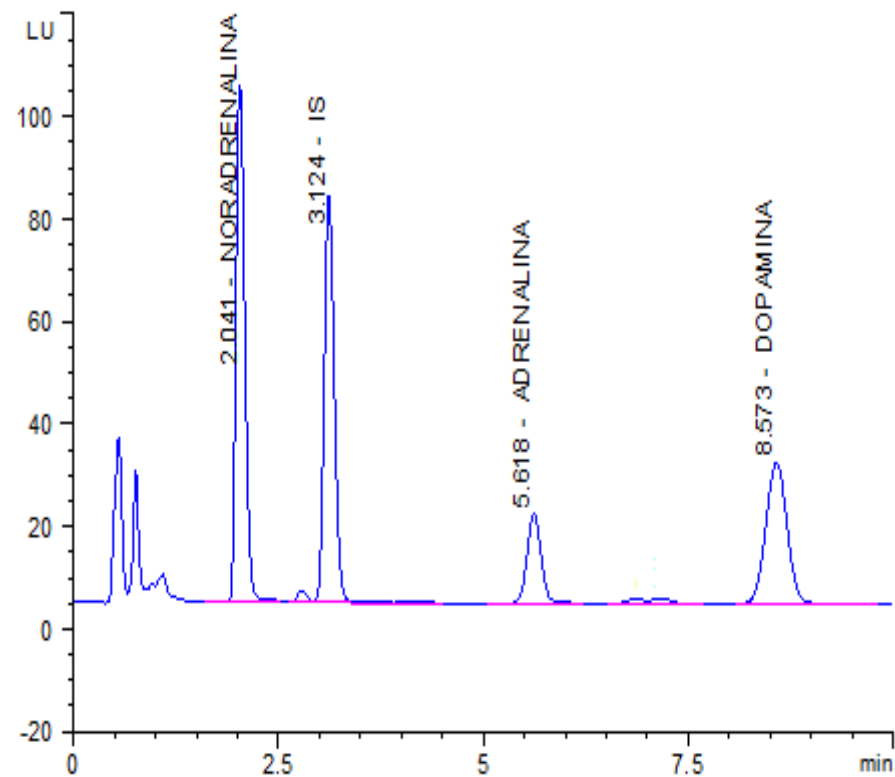


Fig. 4:	Controllo liofilo plasmatico livello 2		
	R.T.	2.04	Noradrenalina 3.243 ng/l
	R.T.	3.12	Standard interno
	R.T.	5.61	Adrenalina 440 ng/l
	R.T.	8.57	Dopamina 1.936 ng/l

CATECOLAMINE PLASMATICHE IN FLUORIMETRIA FAST (Cromatogrammi di Riferimento)

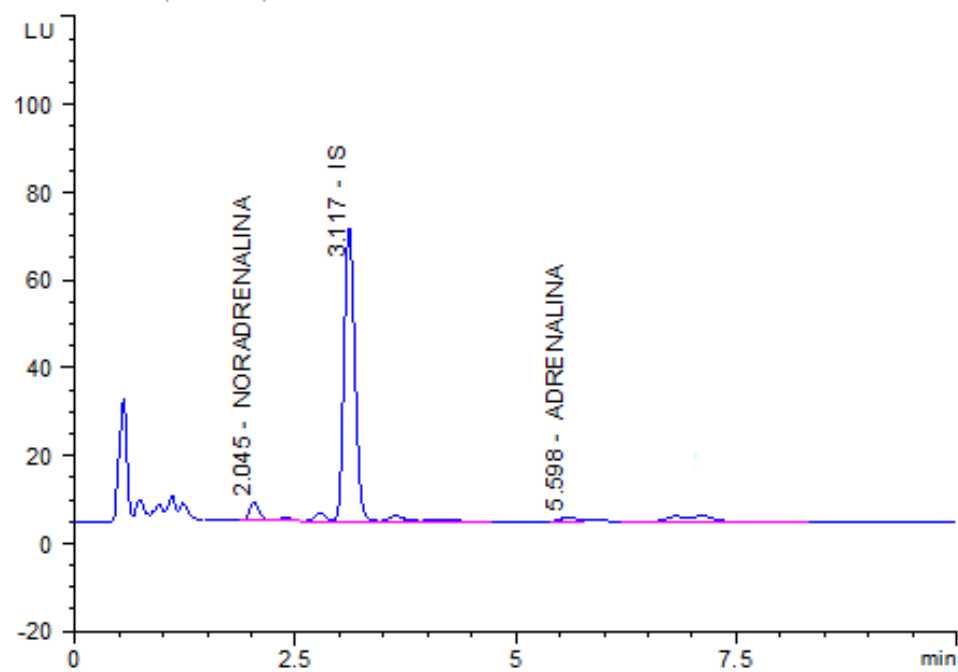


Fig. 5: *Campione plasmatico*

R.T.	2.04	Noradrenalina	205 ng/l
R.T.	3.11	Standard interno	
R.T.	5.59	Adrenalina	17 ng/l