

METANEPHRINES IN URINE-HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Metanefrinas em urina por HPLC.

Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
2020-B	Kit Reagente para Análise de Metanefrinas em Urina (100 análises)

Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Metanefrinas em urina por HPLC no site www.biosys.com.br.

FINALIDADE PRETENDIDA

Este Kit de reagentes é um dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* projetado para usuários profissionais em laboratórios clínicos para a determinação quantitativa das normetanefrinas, metanefrinas e 3-metoxitiraminas totais (soma dos metabólitos livres e conjugados) em amostras de urina humana.

A preparação das amostras é realizada manualmente e a separação analítica é feita por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-ECD).

O ensaio destina-se a pacientes nos quais os níveis urinários de normetanefrina total, metanefrina total e 3-metoxitiramina total são de importância clínica, principalmente como auxílio ao diagnóstico e monitoramento de suspeita de feocromocitoma e paraganglioma.

Além disso, o ensaio destina-se a pacientes nos quais os níveis urinários de normetanefrina total e 3-metoxitiramina total são de importância clínica, como auxílio ao diagnóstico e monitoramento de suspeita de neuroblastoma.

Limitações Clínicas

Não há faixas de referência universalmente aplicáveis para os analitos cobertos pelo ensaio "Metanephrides in urine". Os resultados obtidos com diferentes métodos de teste não podem ser comparados. Os laboratórios devem indicar o método usado nas análises para permitir a interpretação precisa dos resultados.

Os usuários devem especificar seus próprios intervalos de referência com base na avaliação clínica. Os fatores de conversão entre diferentes métodos de análise não devem ser usados para prever resultados para um paciente específico.

Para aumentar a confiabilidade e minimizar o risco de achados falso-negativos, os testes com resultados limítrofes devem ser repetidos [1]. Além disso, são recomendados procedimentos diagnósticos de segunda e terceira ordem (por exemplo, histologia, biópsia, ressonância magnética, tomografia computadorizada, ultrassonografia, cintilografia, endoscopia etc.) [22].

Este produto IVD não é adequado para detectar neoplasias neuroendócrinas que são bioquimicamente silenciosas, não funcionais ou não secretoras, respectivamente.

Em pacientes com neuroblastoma confirmado histologicamente, que concluíram o tratamento, mas têm evidência radiológica de doença residual sem crescimento tumoral detectável, a produção de hormônios, incluindo a 3-metoxitiramina, pode ser baixa ou ausente. Esses pacientes podem, portanto, ter baixos níveis totais de 3-metoxitiramina na urina, apesar da doença residual [18].

Quantidades consideráveis de conjugados de sulfato de 3-metoxitiramina e normetanefrina são formadas principalmente nos tecidos gastrointestinais e excretadas na urina. Dessa forma, os conjugados de sulfatos de fontes de tecido gastrointestinal parcialmente diferentes, contribuem para os níveis urinários de 3-metoxitiramina e normetanefrina. Isso deve ser levado em consideração para níveis elevados [1].

Os pacientes com os seguintes distúrbios podem apresentar valores mais altos de normetanefrina: insuficiência cardíaca,

cardiopatia congênita cianótica, síndrome da apneia do sono, insuficiência renal, acrodistia (envenenamento por mercúrio) e hemorragia intracerebral aguda [1].

Os pacientes com os seguintes distúrbios podem apresentar valores mais altos de metanefrina: pseudofeocromocitoma e dor [1].

Os resultados de pacientes com insuficiência renal podem não ser confiáveis devido à influência da função renal prejudicada na eliminação urinária [1].

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica.

PRINCÍPIO

Esse ensaio permite a determinação quantitativa simultânea de metanefrina, normetanefrina e 3-metoxitiramina na urina como metanefrinas totais (soma de metabólitos livres e conjugados). As formas conjugadas (sulfato e glucuronídeo) são liberadas por hidrólise ácida após o ajuste do pH. Posteriormente, as amostras são purificadas por uma extração eficiente em fase sólida, que pode ser realizada de forma manual ou semiautomática. O ajuste do pH para garantir a extração completa é verificado com base na mudança de cor de um indicador. O uso de um padrão interno específico garante alta precisão e confiabilidade na quantificação dos analitos. Os analitos e o padrão interno são então separados cromatograficamente em uma única análise isocrática de HPLC e quantificados usando um detector eletroquímico (ECD).

REAGENTES

Componentes e Composições:

Componente	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução de acetonitrila	1 x 1000 mL
Mix de Analitos (Mix Analites)	Normetanefrina, metanefrina 3-metoxitiramina, 4-hidroxi-3-metoxibenzilamina Ácido Clorídrico	1 x 10 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	4-hidroxi-3-metoxibenzilamina Ácido Clorídrico	1 x 10 mL
Tampão de Neutralização (Neutralisation Buffer)	Tampão Borato	2 x 300 mL
Tampão de Lavagem (Wash Buffer)	Solução de hidróxido de sódio	2 x 250 mL
Tampão de Eluição (Elution Buffer)	Solução de hidróxido de sódio	2 x 250 mL
Colunas de preparo (Sample Clean Up Columns)	Dióxido de silício	100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada no rótulo, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas.

Temperaturas de armazenamento:

Artigo	Produto	Armazenamento
2021	Fase móvel	18 – 30°C
2033	Mix de analitos	2 – 8°C
2024	Padrão Interno	2 – 8°C
2025	Tampão de Neutralização	18 – 30°C
2026	Tampão de Lavagem	18 – 30°C
2027	Tampão de Eluição	18 – 30°C
2028	Sample Clean Up Columns	18 – 30°C

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Favor consultar a ficha de segurança dos reagentes e adotar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto. As instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

DESCARTE

Resíduos perigosos

A fase móvel (art. 2021) contém solventes orgânicos. Descarte os resíduos do produto em um recipiente coletor para solventes orgânicos livres de halogênio. O Mix de analitos (art. 2033) e o Padrão Interno (art. 2024) contêm um ácido forte. Neutralize os resíduos do produto e descarte-os em um recipiente de coleta para soluções salinas. O Tampão de Lavagem (art. 2026) e o Tampão de Eluição (art. 2027) contêm uma base forte. Neutralize os resíduos do produto e descarte-os em um recipiente de coleta para soluções salinas. Resíduos de amostras de pacientes, amostras preparadas, controles (art. 0040, 0050) e calibrador (art. 2009), bem como consumíveis de laboratório contaminados com material humano, devem ser coletados e descartados como resíduos potencialmente infecciosos.

Os resíduos perigosos não devem ser descartados junto com o lixo doméstico. Não circule no abastecimento de água principal. Faça o descarte de acordo com as diretrizes e regulamentos nacionais e locais em vigor.

Os recipientes de resíduos devem ser armazenados adequadamente e o acesso deve ser permitido apenas a partes autorizadas.

Resíduos não perigosos

O Tampão de Neutralização (art. 2025), bem como os consumíveis de laboratório não contaminados, não são classificados como perigosos. Descarte em conformidade com os requisitos nacionais e locais.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Os reagentes estão prontos para uso.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 2120). Urine Calibration Standard (Chromsystems art. 2009). Endocrine Urine Control, Normal Range (Chromsystems art. 0040). Endocrine Urine Control, Pathological Range (Chromsystems art. 0050). Material geral de laboratório.

AMOSTRA

O material a ser testado é urina. Normalmente, urina de 24 horas são usadas para está análise. Caso seja difícil ou impossível, urina isolada também pode ser utilizada. Nesse caso, os resultados devem ser relacionados à creatinina. Em

certos casos, também pode ser apropriado relacionar a urina de 24 horas à creatinina [10].

Diferentes aminas biogênicas, como catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), metanefrinas (metanefrina, normetanefrina e 3-metoxitiramina) e seus metabólitos (ácido vanililmandélico e ácido homovanílico), bem como serotonina e seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético, são frequentemente dosadas em combinação, e a coleta de urina de 24 horas é demorada e estressante para os pacientes. Consequentemente, é útil ter um procedimento de amostragem universal para todos os analitos.

A interseção da faixa de pH ideal para todos os analitos (normetanefrina, metanefrina e 3-metoxitiramina) na urina é de pH 2,5 a 5,0, que pode ser alcançado pela adição de ácido clorídrico ou acético ao recipiente de coleta antes da coleta da urina. No mesmo pH, não há diferença na estabilidade entre a estabilização com ácido clorídrico ou acético. Alguns analitos também são estáveis em uma faixa de pH mais ampla. Entretanto, os ácidos oxidantes, como o ácido sulfúrico, não são adequados.

Alguns analitos são sensíveis à luz. Consequentemente, as amostras de urina devem ser protegidas da luz durante a coleta e o armazenamento.

Para atingir a faixa ideal de pH de 2,5 a 5,0, recomenda-se adicionar 9 ml de ácido clorídrico a 20% ao recipiente de coleta protegido da luz antes da coleta de urina, que também é usado em um sistema comercial de coleta de urina. Também são comumente usados 10 ml de ácido clorídrico de 10% a 25% ou 10 a 20 ml de ácido acético. O pH resultante depende muito do volume da urina, bem como da capacidade de tamponamento da urina. Consequentemente, o pH deve ser verificado quando as amostras chegam ao laboratório.

Se apenas as metanefrinas totais forem determinadas, também é possível usar a urina de 24 horas sem estabilizadores [11].

Observações importantes sobre interferências farmacocinéticas nos níveis de catecolaminas e metanefrinas urinárias:

Diversos fatores, como dieta e estresse, podem influenciar os níveis de catecolaminas e metanefrinas na urina [23].

A ingestão dos seguintes alimentos pode causar níveis elevados de catecolaminas (o que pode levar a um diagnóstico falso-positivo de PPGL):

Os pacientes devem ser instruídos a não fumar, não consumir álcool e cafeína e a evitar alimentos ricos em catecolaminas ou tiraminas (bananas, feijões, sucos de frutas, nozes, batatas ou tomates) pelo menos 8 a 12 horas antes e durante a coleta de urina [11].

Sabe-se que a nicotina e a cafeína, em particular, aumentam os níveis de adrenalina [1], assim como o queijo duro e vinho tinto para aumentar os níveis de noradrenalina [11].

A ingestão dos seguintes alimentos pode causar níveis elevados de metanefrinas (o que pode levar a um diagnóstico falso-positivo de PPGL e/ou neuroblastoma):

Os pacientes devem ser instruídos a evitar alimentos ricos em catecolaminas ou tiraminas (feijão, sucos de frutas, batatas, vinho tinto, tomates) pelo menos 8 a 12 horas antes e durante a coleta de urina [11].

Os pacientes devem ser instruídos a não fumar, não consumir álcool e cafeína e a evitar alimentos ricos em catecolaminas ou tiraminas (amêndoas, bananas, chá preto, queijo, chocolate, ovos, nozes ou baunilha) pelo menos 3 dias antes e durante a coleta de urina [24].

A ingestão dos seguintes medicamentos pode causar níveis elevados de catecolaminas e metanefrinas (o que pode levar a um diagnóstico falso-positivo de PPGL e/ou neuroblastoma):

agonistas/simpaticomiméticos dos receptores α -adrenérgicos (por exemplo, efedrina, pseudoefedrina, fenilefrina), levodopa (L-DOPA), α -metildopa, metanfetamina, nitroglicerina, narcóticos e psicoestimulantes (por exemplo,

anfetaminas), teofilina, fenoxibenzamina (usado como anti-hipertensivo em pacientes com feocromocitoma), tetraciclina e antibióticos tricíclicos [11,23-25]. Desses, especialmente pseudoefedrina, anfetaminas e fenoxibenzamina são conhecidas por aumentar os níveis de noradrenalina [1]. Além disso, carbidopa pode levar a níveis mais altos de dopamina [11].

Além disso, sabe-se que cocaína, inibidores da monoamina oxidase (IMAOs), morfina e os inibidores da recaptação de serotonina, em particular, aumentam os níveis de metanefrina [24].

Especialmente clozapina, mirtazapina, quetiapina e risperidona são conhecidas por aumentar os níveis de noradrenalina [1].

A ingestão dos seguintes medicamentos pode causar níveis reduzidos de catecolaminas e metanefrinas (o que pode levar a um diagnóstico falso-negativo de PPGL e/ou neuroblastoma):

α-metil-para-tirosina e reserpina [23].

Especialmente venlafaxina/duloxetina e cocaína podem levar a níveis mais baixos de noradrenalina [1].

Os dados de estabilidade a seguir são baseados em investigações internas. Como a literatura não descreve uma dependência do doador na estabilidade nem foi encontrada em pré-testes, um pool de urina de várias pessoas saudáveis foi analisado após a acidificação com ácido clorídrico (HCl) e ácido acético (HOAc), bem como sem acidificação. Em todos os casos, as amostras foram protegidas da luz e bem fechadas.

Estabilidade das amostras:

Temperatura de armazenamento	Vida útil de armazenamento	
	pH 1,5 (HCl)	pH 2,5 (HCl)
+20 a +25°C	2 semanas	2 semanas
+2 a +8°C	4 semanas	4 semanas
abaixo -18°C	4 semanas	4 semanas
Ciclos de congelamento/descongelamento	3 ciclos	3 ciclos

Temperatura de armazenamento	Vida útil de armazenamento		
	pH 3,5 (HCl/HOAc)	pH 5,0 (HCl/HOAc)	pH 6,1 (sem acidificação)
+20 a +25°C	2 semanas	2 semanas	2 semanas
+2 a +8°C	4 semanas	4 semanas	4 semanas
abaixo -18°C	4 semanas	4 semanas	4 semanas
Ciclos de congelamento/descongelamento	3 ciclos	3 ciclos	3 ciclos

É responsabilidade de cada laboratório usar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar os critérios específicos de estabilidade.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Volume de injeção: 20 µL (preparação manual da amostra);
Tempo de corrida: 15 min (Padrão Interno art. 2024)

Taxa de fluxo: 1 mL/min

Temperatura da coluna: +20 a +25°C

Solução de limpeza da agulha para o injetor: água/metanol, 90/10 v/v

Otimização do potencial de trabalho

A experiência tem mostrado que a curva de potencial de sinal/trabalho para uma determinada substância difere de detector para detector. Isso se deve ao fato de que os sistemas de referência (eletrodos de referência) nos diferentes detectores não são completamente idênticos e, portanto, produzem diferentes potenciais de referência. Isso significa que o potencial de trabalho ideal para um sistema HPLC com detecção eletroquímica deve ser determinado empiricamente por meio da injeção de uma mistura padrão em diferentes potenciais de trabalho. Para otimizar a análise de metanefrinas,

é usada a área ou a altura do pico do Padrão Interno 1 (ISTD1) - contido no Mix de analitos (art. 2033) - uma vez que sua transformação eletroquímica exige o potencial de trabalho mais alto.

O procedimento a seguir é recomendado para o uso do ECD CLC 100 da Chromsystems:

1. Ajuste o potencial de trabalho para +740 mV e injete o Mix de analitos (art. 2033), determine as alturas/áreas do pico para o Padrão interno
2. Aumente o potencial de trabalho em 40 mV e injete o Mix de analitos, determine as alturas/áreas do pico para o Padrão interno
3. Se a altura/área do pico aumentar em mais de 15% → repita a etapa 2.

Se a altura/área do pico aumentar em menos de 15% → reduza o potencial para o último valor (-40 mV).

O potencial de trabalho ideal determinado por este método é geralmente de +780 a +840 mV (em comparação com o eletrodo de referência Ag/AgCl) ao utilizar o ECD CLC 100 da Chromsystems e não é influenciado pela manutenção de rotina da célula de medição (por exemplo, substituição da solução de KCl, ativação do eletrodo de trabalho).

No entanto, após grandes perturbações na célula de medição (por exemplo, substituição do eletrodo de referência), a otimização do potencial de trabalho deve ser repetida.

Procedimento manual de preparo de amostras:

Importante:

A proteção adequada contra a luz é essencial para todas as amostras, calibrador (art. 2009), controles (art. 0040 e 0050), Mix de Analitos (art. 2033) e o Padrão Interno (art. 2024). Não os exponha à luz solar direta em nenhum momento.

Certifique-se de que o lote de reagentes (incluindo o padrão interno) utilizado para o preparo da amostra, bem como o lote do calibrador e do controle, não sejam alterados dentro de uma sequência.

Se vários frascos do Padrão Interno forem necessários para uma sequência de preparo da amostra, junte-os antes do uso.

Antes do preparo da amostra, deixe os reagentes/calibradores/controles/amostras armazenados congelados ou refrigerados atingirem a temperatura ambiente e misture bem. Para preparar amostras de pacientes, calibradores e controles para análise, siga as seguintes etapas na ordem indicada:

Hidrólise ácida

1. Pipete 100 µL de Padrão Interno (art. 2024) em um tubo adequado
2. Adicione 1 mL de amostra/calibrador/controle
3. Ajuste o pH para 0,8-1,0 usando HCl 2N
4. Feche o tubo e incube a 95°C em um banho-maria por 30 minutos
5. Esfrie imediatamente

Neutralização:

6. Adicione 6 mL de Tampão de Neutralização (art. 2025) à urina hidrolisada

Cuidado!

Nesta etapa deve ocorrer uma mudança de cor de amarelo-amarronzado para roxo!

Se a amostra mantiver a cor amarelo-amarronzado: adicione NaOH 2N, gota a gota, até que ocorra uma mudança de cor.

Extração

7. Agite a Sample Clean Up Column (art. 2028) para ressuspender o conteúdo
8. Retire a tampa da coluna e remova o bocal de vedação
9. Deixe o tampão de equilíbrio fluir completamente e descarte o efluente
10. Aplique toda a urina diluída na Sample Clean Up Column deje fluir e descarte o efluente
11. Lave com 10 mL de água de alta pureza e descarte o efluente

12. Lave com 5 mL de Tampão de lavagem (art. 2026), descarte o efluente
 13. Adicione 5 mL de Tampão de eluição (art. 2027) à Sample Clean Up Column e cole o eluado em um frasco adequado

- Continuação da preparação da amostra antes da injeção:*
 14. Adicione 150 μ L de ácido acético glacial ao eluado e misture brevemente
 15. Injete 20 μ L do eluado estabilizado no sistema HPLC.

Estabilidade das amostras preparadas

Temperatura de armazenamento	Vida útil de armazenamento	Outras condições de armazenamento
+20 a +25°C	3 dias	Protegido da luz, bem fechado, frascos de vidro
+2 a +8°C	7 dias	Protegido da luz, bem fechado, frascos de vidro
Abaixo de -18°C	4 semanas	Protegido da luz, bem fechado, frascos de vidro
Ciclos de congelamento/descongelamento	1 ciclo	-

Misture bem os eluatos descongelados antes da injeção.

Tempos de retenção esperados

A tabela a seguir mostra os tempos de retenção aproximados dos analitos e Padrões Internos a uma vazão de 1,0 mL/min.:

Analito	Tempo de retenção aprox.
Normetanefrina	5,5 min.
Metanefrina	7,0 min.
Padrão Interno 1 (ISTD 1)*	8,3 min.
3-Metoxitiramina	12,5 min.

*componente do artigo 2024

Os tempos de retenção podem variar ligeiramente, por exemplo, se houver uma mudança na temperatura ambiente, se você usar um novo lote de fase móvel ou se você substituir a coluna de HPLC. Portanto, use um cromatograma de calibração para determinar os valores atuais.

Manipulação de amostras acima da faixa de medição analítica

Amostras de pacientes cujas concentrações de analito estejam acima da faixa de medição analítica devem ser tratadas da seguinte forma:

Antes da preparação da amostra, dilua a amostra original do paciente com ácido clorídrico 2 mM em uma proporção de até 1:100 para que o resultado da análise, independentemente do fator de diluição, esteja dentro da faixa de medição do método. Em seguida, prepare as amostras conforme descrito no item "Procedimento manual de preparo de amostras".

Ao calcular as concentrações dos analitos nas amostras, o fator de diluição deve ser levado em consideração.

Controle de Qualidade

Monitore a veracidade e a precisão das análises incluindo controles em cada análise, pelo menos uma vez durante e no final de uma série de amostras. Se a análise desses controles apresentar valores fora da faixa indicada na Instrução de Uso do produto utilizado, verifique o sistema e tome as medidas apropriadas. Se a discrepância persistir, recalibre o sistema.

A Chromsystems disponibiliza os seguintes controles:

Artigo	Produto	Apresentação
0040	Endocrine Urine Control, Normal Range	10 x 8,0 mL (liof.)
0050	Endocrine Urine Control, Pathological Range	10 x 8,0 mL (liof.)

Calibração do sistema de análise

Realize uma calibração do sistema de análise para cada série de medições. A Chromsystems disponibiliza o seguinte produto, Urine Calibration Standard (art. 2009). As

concentrações dos analitos no calibrador são dependentes do lote. Os níveis exatos são fornecidos na Instrução de Uso do produto.

As curvas de calibração são construídas calculando a razão entre a área ou altura do pico do analito e do padrão interno (ISTD) no eixo y, em relação à concentração do calibrador no eixo x. Em seguida, plote uma curva de calibração passando pela origem para todos os analitos (calibração de ponto único).

Selecione o método de padrão interno para calibração no seu sistema de análise e defina a concentração dos padrões internos como "1".

Fatores de conversão

Analito	μ g/L para nmol/L μ g/24 h para nmol/24 h	nmol/L para μ g/L nmol/24 h para μ g/24 h
Normetanefrina	x 5,458	x 0,1832
Metanefrina	x 5,070	x 0,1972
3-Metoxitiramina	x 5,981	x 0,1672

Para a conversão de dados com referência à creatinina, aplicam-se os seguintes fatores de conversão.

Analito	μ g/g de creatinina para nmol/L de creatinina	nmol/L de creatinina para μ g/g de creatinina
Normetanefrina	x 0,6174	x 1,620
Metanefrina	x 0,5735	x 1,744
3-Metoxitiramina	x 0,6765	x 1,478

CÁLCULOS

Para o cálculo manual, os seguintes dados são requeridos:

- Área/altura do pico da substância A no cromatograma da amostra = A_{amostra}
- Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS_{amostra}
- Inclinação da curva de calibração = a

Calcule a concentração da substância A na amostra (Camostra) da seguinte forma:

$$\text{Camostra} = \frac{A_{\text{amostra}}}{IS_{\text{padrão}}} a$$

DADOS DE DESEMPENHO ANALÍTICO

Linearidade / limite de quantificação:

O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi determinado utilizando diluições definidas de amostras de urina com água. O limite superior de quantificação (ULOQ) foi determinado pela adição de quantidades definidas de substâncias padrão às amostras de urina. A preparação da amostra foi realizada com o Padrão Interno (artigo 2024).

Analito	LLOQ	ULOQ
Normetanefrina	4,5 μ g/L	3000 μ g/L
Metanefrina	7,3 μ g/L	5900 μ g/L
3-Metoxitiramina	9,9 μ g/L	5900 μ g/L

Repetibilidade intra-ensaio

Os coeficientes de variação foram determinados em três concentrações diferentes por meio da preparação repetida ($n=10$) da mesma amostra de urina em uma sequência. A preparação da amostra foi realizada manualmente utilizando o Padrão Interno (art. 2024).

Analito	CV% (concentração em μ g/L)		
Normetanefrina	1,4 (325)	1,0 (708)	0,8 (968)
Metanefrina	1,0 (189)	2,7 (275)	0,9 (362)
3-Metoxitiramina	2,1 (164)	1,8 (264)	0,9 (357)

Repetibilidade entre ensaios

A determinação da repetibilidade inter-ensaios foi feita em duas concentrações diferentes por meio da preparação repetida (n = 10) da mesma amostra de urina em 10 dias diferentes. A preparação da amostra foi realizada manualmente utilizando o Padrão Interno (art. 2024).

Analito	CV% (concentração em µg/L)	
Normetanefrina	2,7 (351)	1,7 (1427)
Metanefrina	2,4 (170)	2,6 (1206)
3-Metoxitiramina	4,4 (153)	3,5 (1276)

Precisão (reprodutibilidade)

Os dados de desempenho foram determinados em 3 locais com base em 5 amostras de urina diferentes por meio do processamento de 5 vezes em 5 dias diferentes. O procedimento é baseado no CLSI EP05-A3 e corresponde a um projeto de teste 3 x 5 x 5. A preparação das amostras foi feita manualmente em dois locais e de forma semiautomatizada no terceiro local.

Reprodutibilidade, determinação com Padrão Interno (art.2024)

Analito	Conc. Média	CV	IC95%
Normeta-nefrina	20,2 µg/L	14,1 %	10,3-22,4 %
	99,8 µg/L	6,4 %	3,9 - 18,4 %
	288 µg/L	4,8 %	3,2 - 9,9 %
	1305 µg/L	4,7 %	3,1 - 9,5 %
	2313 µg/L	4,4 %	3,1 - 7,6%
Metanefrina	24,3 µg/L	7,2 %	5,9 - 9,2 %
	74,0 µg/L	7,4 %	5,5 - 11,3 %
	235 µg/L	5,4 %	3,3 - 14,0 %
	2400 µg/L	5,4 %	3,5 - 11,2 %
	4538 µg/L	4,5 %	3,1 - 8,0 %
3-Metoxitiramina	26,3 µg/L	10,7 %	7,9 - 16,5 %
	58,2 µg/L	9,9 %	7,0 - 16,8 %
	164 µg/L	6,5 %	4,3 - 12,5 %
	2446 µg/L	6,3 %	4,7 - 9,6 %
	4787 µg/L	6,7 %	5,0 - 10,0 %

INTERFERENTES CONHECIDOS

Na presença das seguintes substâncias, interferências foram observadas:

A presença das interferências declaradas pode afetar a precisão dos resultados do teste em >15% ou causar picos de interferência.

A amoxicilina, um medicamento antibiótico, causa vários picos adicionais. A precisão dos resultados de todos os analitos pode ser afetada. Além disso, a amoxicilina causa uma interferência que não foi observada na injeção primária. Mas ela elui em um tempo de 33 a 38 minutos nas injeções subsequentes e pode afetar a precisão dos resultados do teste.

A diidralazina, um medicamento anti-hipertensivo, causa vários picos adicionais. A precisão dos resultados de todos os analitos pode ser afetada.

A dopamina, um neurotransmissor, causa vários picos adicionais. As concentrações de dopamina > 14,2 mg/L podem afetar a concentração dos resultados do teste para todos os analitos.

A hidralazina, um medicamento anti-hipertensivo, elui em um tempo de 12 a 30 minutos na injeção primária e nas injeções subsequentes e pode afetar a precisão dos resultados do teste.

A metenamina (urotropina), um medicamento antisséptico e antibacteriano, causa vários picos adicionais e supressão de sinal. A precisão dos resultados de todos os analitos pode ser afetada.

A serotonina, um neurotransmissor, causa vários picos adicionais. As concentrações de serotonina > 2,24 mg/L podem afetar a concentração dos resultados do teste.

O Padrão Interno 1 é uma substância de ocorrência natural que pode ser elevada por determinados hábitos alimentares.

As substâncias a seguir foram testadas e não apresentaram pico interferente e/ou tiveram influência insignificante nos resultados quantitativos (desvio ≤15%).

Acetaminofeno (paracetamol), ácido N-acetil-5-amino salicílico, adenosina, adrenalina, alopurinol, alprazolam, amlodipina, anfetamina/dexamfetamina, apixaban, atenolol, azitromicina, bisoprolol, candesartan, capecitabina, carvedilol, cefuroxima, citalopram, clonazepam, ácido 3,4-dihidroximandélico (DOMA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG), L-dopa, doxorrubicina, edoxabana, empagliflozina, enalaprilato, fluoxetina, fomoterol, furosemida, gabapentina, glipizida, ácido homovanílico (HVA), hidroclorotiazida, hidrocodona, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), brometo de ipratropípico, labetalol, levotiroxina, lisinopril, losartana, mesalazina (5-mesalamina, ácido 5-aminossalicílico), metamizol/dipirona como 4-metilaminoantipirina, metformina, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MPG), metildopa, metoclopramida, metoprolol, metirosina, minoxidil, noradrenalina, fenprocoumon, pravastatina, pregabalina, ranitidina, rivaroxaban, rosuvastatina, salbutamol/albuterol, sitagliptina, sotalol, tamsulosina, tilidina como nortilidina, torasemida, tramadol, uradipil, valsartana, ácido vanilmandélico (VMA), venlafaxina.

DADOS DE DESEMPENHO CLÍNICO

O método do ensaio da Chromsystems "Metanefrines in urine" (art. 2020-B) e o método da literatura apresentado abaixo são equivalentes, conforme comprovado por comparações de métodos internos realizadas na Chromsystems.

NM= Normetanefrina; M= Metanefrina
3-MT= 3-Metoxitiramina

Dados de desempenho clínico relativos a feocromocitoma e parangangioma para M e NM combinados [9]

Limite (corte superior)	450 µg/24 h para NM 350 µg/24 h para M
Sensibilidade diagnóstica	98,3% comb. para NM e M
Especificidade diagnóstica	85,6% comb. para NM e M
Valor preditivo positivo	45,9% comb. para NM e M
Valor preditivo negativo	99,8% comb. para NM e M
Razão de verossimilhança positiva	6,83 comb. para NM e M
Razão de verossimilhança negativa	0,02 comb. para NM e M
Idade do paciente (anos)	40-66
Valores esperados em uma população normal	Concentrações de urina como medianas (e intervalos): 252 (30-1194) µg/24h para NM 84 (6-651) µg/24 h para M
Valores esperados na população afetada	Concentrações de urina como medianas (e intervalos): <i>Antes da cirurgia</i> 2229 (319-20112) µg/24h para NM 289 (37-17719) µg/24 h para M <i>Após a cirurgia</i> 271 (143-909) µg/24 h para NM 59 (11-312) µg/24 h para M

Dados de desempenho clínico relativos a feocromocitoma e parangangioma para 3-MT [10]

Limite (corte superior)	205 nmol/mmol de creatinina ou seja, 303 µg/g de creatinina*
Sensibilidade diagnóstica	61,1%
Especificidade diagnóstica	94,1%
Valor preditivo positivo	95,6%
Valor preditivo negativo	53,0%

Razão de verossimilhança positiva	10,36
Razão de verossimilhança negativa	0,41
Valores esperados em uma população normal	Concentrações de urina como medianas (e intervalos), (idade média: 59): 97,5 (45,8-224,2) nmol/mmol de creatinina ou seja, 144 (67,7-331,4) µg/g de creatinina*
Valores esperados na população afetada	Concentrações de urina como medianas (e intervalos): Doenças esporádicas (idade média: 49 anos) 247,5 (97,7-5694) nmol/mmol de creatinina Ou seja, 366 (144,4-8417) µg/g de creatinina Doenças hereditárias (idade média: 38 anos) 253 (82,9-887) nmol/mmol de creatinina ou seja, 374 (122,5-1311) µg/g de creatinina

* Os valores em µg/g de creatinina não foram incluídos na literatura original, mas foram calculados posteriormente usando os fatores de conversão informados no ítem "Fatores de conversão".

Dados de desempenho clínico relativos ao neuroblastoma para NM [16,17]

Limite (corte superior)	Observação: Não há estudos clínicos para a normetanefrina total urinária com relação ao neuroblastoma. Ainda assim, sua relevância como auxílio ao diagnóstico e monitoramento de suspeita de neuroblastoma é suficientemente definida pela validade científica e pelo estado da arte (MDCG 2022-2).
Sensibilidade diagnóstica	
Especificidade diagnóstica	
Valor preditivo positivo	
Valor preditivo negativo	
Razão de verossimilhança positiva	
Razão de verossimilhança negativa	
Valores esperados em uma população normal	
Valores esperados na população afetada	

Dados de desempenho clínico relativos ao neuroblastoma para o 3-MT [18]

Os seguintes dados foram obtidos em diferentes grupos de pacientes:

Doença não tratada: pacientes com neuroblastoma histologicamente comprovado, nos quais as medições dos marcadores tumorais foram realizadas antes do tratamento.

Doença em avanço: pacientes com neuroblastoma histologicamente comprovado que receberam tratamento, mas apresentavam evidências radiológicas de doença progressiva, ou pacientes em tratamento ativo.

Percentil 90**			
Limite (corte superior)	Idade [anos]	3-MT [nmol/mmol de creatinina]	3-MT [µg/g de creatinina*]
0-1,0	741	1095	
1,0-3,0	479	708	
3,0-7,0	186	275	
7,0-12	153	226	
12-15	99,4	146,9	
**Percentil 90 do grupo de controle (sem evidência histológica ou outra evidência de neuroblastoma)			

Sensibilidade diagnóstica	Sem tratamento: 100% Avançando: 88,9%
Especificidade diagnóstica	Sem tratamento: 94,4% Avançando: 91,1%
Valor preditivo positivo	Sem tratamento: 41,2% Avançando: 70,6%
Valor preditivo negativo	Sem tratamento: 100% Avançando: 97,2%
Razão de verossimilhança positiva	Sem tratamento: 18,0 Avançando: 10,0
Razão de verossimilhança negativa	Sem tratamento: 0 Avançando: 0,12
Valores esperados em uma população normal	Faixa observada (0-15 anos): 29-1135 nmol/mmol de creatinina ou seja, 43-1678 µg/g de creatinina*
Valores esperados na população afetada	Faixas observadas: Não tratado (0,7-3,0 anos): 743-26217 nmol/mmol de creatinina ou seja, 1098-38753 µg/g de creatinina* Avançando (0,3-9,0 anos): 401-6581 nmol/mmol de creatinina ou seja, 593-9728 µg/g de creatinina*

* Os valores em µg/g de creatinina não foram incluídos na literatura original, mas foram calculados posteriormente usando os fatores de conversão informados no ítem "Fatores de conversão".

Faixas de referência e valores de cut-off

As faixas de referência para as aminas biogênicas variam consideravelmente e dependem muito da idade e do sexo. Recomendamos estabelecer uma faixa de referência específica para cada laboratório. Ao determinar os intervalos, certifique-se de cumprir os requisitos regionais e nacionais.

Observação:

Os intervalos de referência listados a seguir representam níveis encontrados em uma proporção de uma população saudável/sem doenças. Consequentemente, eles não se alinham necessariamente com os níveis de decisão clinicamente relevantes ou com os valores de corte referentes à finalidade pretendida deste dispositivo. Para obter dados de desempenho clínico, incluindo níveis de decisão e/ou valores esperados ou detectados em pessoas afetadas e não afetadas, consulte as tabelas no ítem acima "Dados de Desempenho Clínico". Esses dados de desempenho clínico referem-se apenas ao presente método Chromsystems.

Os seguintes intervalos de referência e valores de corte são guias baseados na literatura [26, 27]. Eles mostram a diversidade de faixas de referência e valores de corte publicados por diferentes laboratórios em todo o mundo. Eles podem diferir de outros dados publicados.

Como os níveis variam dependendo da população de pacientes e do método de medição, determine intervalos de referência específicos para o seu laboratório. Atenção especial deve ser dada aos intervalos de referência para casos hereditários. Enquanto a secreção hormonal é muito alta em casos esporádicos, os níveis em casos genéticos estão apenas levemente acima do normal [9].

Intervalos de referência para normetanefrina (livre+conjugada)

Coletivo de pacientes	Faixas de referência expressas como proporções de creatinina [27]
Crianças	
até 3 meses	956-2460 µg/g de creatinina
4-6 meses	437-2060 µg/g de creatinina
7-12 meses	308-1410 µg/g de creatinina
1-3 anos	16,2-777 µg/g de creatinina

3-5 anos	16,2-745 µg/g de creatinina
5-11 anos	0-534 µg/g de creatinina
> 11 anos	32,4-308 µg/g de creatinina

Intervalos de referência para metanefrina (livre+conjugada)

Coletivo de pacientes	Faixas de referência expressas como proporções de creatinina [27]
Crianças	
até 6 meses	87,2-697 µg/g de creatinina
7-9 meses	105-418 µg/g de creatinina
10-12 meses	87,2-715 µg/g de creatinina
1-3 anos	17,4-418 µg/g de creatinina
3-5 anos	17,4-628 µg/g de creatinina
5-8 anos	0-523 µg/g de creatinina
> 8 anos	0-331 µg/g de creatinina

Intervalos de referência para 3-metoxitiramina (livre+conjugada)

Coletivo de pacientes	Intervalos de referência por 24 horas [26]
Adultos	masculino 86,3-528 µg/24 h feminino 79,3-882 µg/24 h

LITERATURA

1. Eisenhofer G, Pamporaki C, Lenders JWM: Biochemical Assessment of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Endocr Rev* 2023; 44:862-909.
2. van Berkel A, Lenders JWM, Timmers HJLM: Diagnosis of endocrine disease: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma. *Eur J Endocrinol* 2014; 170:R109-19.
3. Lattke P, Peitzsch M, Darr R, Siegert G, Eisenhofer G: Labordiagnostik Katecholamin-produzierender Tumoren. *LaboratoriumsMedizin* 2013; 37:187-197.
4. Barron J: Phaeochromocytoma: diagnostic challenges for biochemical screening and diagnosis. *J Clin Pathol* 2010; 63:669-674.
5. Eisenhofer G, Peitzsch M: Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Chem* 2014; 60:1486-1499.
6. Unger N, Pitt C, Schmidt IL, Walz MK, Schmid KW, Philipp T, et al.: Diagnostic value of various biochemical parameters for the diagnosis of pheochromocytoma in patients with adrenal mass. *Eur J Endocrinol* 2006; 154:409-417.
7. Woo H in, Yang JS, Oh HJ, Cho YY, Kim JH, Park H-D, et al.: A simple and rapid analytical method based on solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of free catecholamines and metanephrenes in urine and its application to routine clinical analysis. *Clin Biochem* 2016; 49:573-579.
8. Xiong X, Zhang Y: Simple, rapid, and cost-effective microextraction by the packed sorbent method for quantifying of urinary free catecholamines and metanephrenes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in clinical analysis. *Anal Bioanal Chem* 2020; 412:2763-2775.
9. Pussard E, Chaouch A, Said T: Radioimmunoassay of free plasma metanephrenes for the diagnosis of catecholamine-producing tumors. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52:437-444.
10. d'Herbomez M, Forzy G, Bauters C, Tierny C, Pigny P, Carnaille B, et al.: An analysis of the biochemical diagnosis of 66 pheochromocytomas. *Eur J Endocrinol* 2007; 156:569-575.
11. Grouzmann E, Lamine F: Determination of catecholamines in plasma and urine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27:713-723.
12. Eisenhofer G, Goldstein DS, Sullivan P, Csako G, Brouwers FM, Lai EW, et al.: Biochemical and clinical manifestations of dopamine-producing paragangliomas: utility of plasma methoxytyramine. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:2068-2075.
13. Eisenhofer G, Lenders JWM, Timmers H, Mannelli M, Grebe SK, Hofbauer LC, et al.: Measurements of plasma methoxytyramine, normetanephrine, and metanephrine as discriminators of different hereditary forms of pheochromocytoma. *Clin Chem* 2011; 57:411-420.

14. Peitzsch M, Prejbisz A, Krois M, Beuschlein F, Arlt W, Januszewicz A, et al.: Analysis of plasma 3-methoxytyramine, normetanephrine and metanephrine by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: utility for diagnosis of dopamine-producing metastatic pheochromocytoma. *Ann Clin Biochem* 2013; 50:147-155.
15. Verly IRN, van Kuilenburg ABP, Abeling NGGM, Goorden SMI, Fiocco M, Vaz FM, et al.: Catecholamines profiles at diagnosis: Increased diagnostic sensitivity and correlation with biological and clinical features in neuroblastoma patients. *Eur J Cancer* 2017; 72:235-243.
16. Candito M, Thyss A, Albertini M, Deville A, Politano S, Mariani R, et al.: Methylated catecholamine metabolites for diagnosis of neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1992; 20:215-220.
17. Monsaingeon M, Perel Y, Simonnet G, Corcuff J-B: Comparative values of catecholamines and metabolites for the diagnosis of neuroblastoma. *Eur J Pediatr* 2003; 162:397-402.
18. Lam L, Woollard GA, Teague L, Davidson JS: Clinical validation of urine 3-methoxytyramine as a biomarker of neuroblastoma and comparison with other catecholamine-related biomarkers. *Ann Clin Biochem* 2017; 54:264-272.
19. Barco S, Gennai I, Reggiardo G, Galleni B, Barbagallo L, Maffia A, et al.: Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *Clin Biochem* 2014; 47:848-852.
20. Barco S, Verly I, Corrias MV, Sorrentino S, Conte M, Tripodi G, et al.: Plasma free metanephrenes for diagnosis of neuroblastoma patients. *Clin Biochem* 2019; 66:57-62.
21. Peitzsch M, Butch ER, Lovorn E, Mangelis A, Furman WL, Santana VM, et al.: Biochemical testing for neuroblastoma using plasma free 3-O-methyldopa, 3-methoxytyramine, and normetanephrine. *Pediatr Blood Cancer* 2020; 67:e28081.
22. Fishbein L, Del Rivero J, Else T, Howe JR, Asa SL, Cohen DL, et al.: The North American Neuroendocrine Tumor Society Consensus Guidelines for Surveillance and Management of Metastatic and/or Unresectable Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Pancreas* 2021; 50:469-493.
23. Gressner AM, Arndt T (ed): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer, Berlin, Heidelberg, 2019.
24. Garcia-Carbonero R, Matute Teresa F, Mercader-Cidoncha E, Mitjavila-Casanovas M, Robledo M, Tena I, et al.: Multidisciplinary practice guidelines for the diagnosis, genetic counseling and treatment of pheochromocytomas and paragangliomas. *Clin Transl Oncol* 2021; 23:1995-2019.
25. Lenders JWM, Duh Q-Y, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo A-P, Grebe SKG, Murad MH, et al.: Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:1915-1942.
26. Peitzsch M, Pelzel D, Glockner S, Prejbisz A, Fassnacht M, Beuschlein F, et al.: Simultaneous liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of urinary free metanephrenes and catecholamines, with comparisons of free and deconjugated metabolites. *Clin Chim Acta* 2013; 418:50-58.
27. Griffin A, O'Shea P, FitzGerald R, O'Connor G, Tormey W: Establishment of a paediatric age-related reference interval for the measurement of urinary total fractionated metanephrenes. *Ann Clin Biochem* 2011; 48:41-44.

Símbolos utilizados:

	Fabricante
	Número de catálogo
	Quantidade suficiente para n ensaios
	Código do lote
	Validade
	Limite de temperatura
	Consultar as instruções para utilização
	Produto para a saúde para diagnóstico <i>in vitro</i>

	Cuidado
	Atenção
	Atenção
	Atenção
	Este produto cumpre as exigências da Regulation (EU) 2017/746 relativa aos dispositivos médicos para uso em diagnóstico in vitro

Fabricante: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12 - 82166 Gräfelfing - Alemanha
Regularizado por: BioSys Ltda
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
CEP: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79
Anvisa: 10350840132
SAC: sac@biosys.com.br - (21) 3907-2534 / 0800 015 1414
www.biosys.com.br