

Validazione del dosaggio delle metanefrine plasmatiche mediante cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem

Manuela Lucchiari, Antonello Nonnato, Anna Rita Vitale, Silvia Incardona, Francesco Martinelli, Stefania Vitali, Giulio Mengozzi

Struttura Complessa Biochimica Clinica, Città della Salute e della Scienza di Torino, Sede Molinette, Torino

Questo lavoro è stato in parte presentato al 47° Congresso Nazionale SIBioC, 26-28 ottobre 2015, Firenze, sotto forma di poster, ricevendo, nella persona del suo primo autore (M. Lucchiari), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

ABSTRACT

Validation of the measurement of plasma metanephrines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The prevalence of arterial hypertension is very high all over the world. ~0.1% of subjects with secondary hypertension has a pheochromocytoma, a tumor producing catecholamines. The quantification of free plasma o-methylated metabolites, metanephrine (p-MN) and normetanephrine (p-NMN), is considered the most accurate test for both the diagnosis and monitoring of pheochromocytoma. The aim of this work was to validate of an assay for measuring plasma metanephrines by LC-MS/MS. Calibration curves showed good linearity ($R^2 > 0.99$). Intra-assay repeatability, assessed on two pools, normal and pathological, resulted in a CV of 5.1% and 3.9% for p-MN and 8.2% and 10.5% for p-NMN, respectively. Inter-assay CVs were 15.9% and 11.9% for p-MN and 16.6% and 16.1% for p-NMN, respectively. The limit of detection was 8 pM for p-MN and 66 pM for p-NMN, while the limit of quantification was 26 pM for p-MN and 83 pM for p-NMN. 638 plasma samples were analyzed, providing a representative sample to assess potential clinical impact of the validated method.

INTRODUZIONE

I feocromocitomi e i paragangliomi sono tumori neuroendocrini caratterizzati da un'eccessiva produzione di catecolamine (adrenalina, noradrenalina e dopamina), che causano sintomi caratteristici come ipertensione, sudorazione, tachicardia e palpitazione (1). La prevalenza di feocromocitoma in soggetti con ipertensione arteriosa è stimata tra 0,1% e 0,5% (2). La presentazione clinica della malattia è aspecifica e molto variabile. Sono richieste, quindi, indagini biochimiche altamente sensibili e specifiche per una corretta diagnosi e per il monitoraggio della patologia.

Il profilo ormonale plasmatico e urinario del feocromocitoma è valutato al meglio dalla misura dei metaboliti O-metilati (normetanefrina e metanefrina) delle catecolamine, piuttosto che dalle catecolamine stesse (3). A differenza delle catecolamine, che sono secrete solo episodicamente e hanno un'emivita

relativamente breve, le metanefrine sono prodotte continuamente dalle cellule del tumore a partire da catecolamine immagazzinate in vescicole e hanno un'emivita plasmatica più lunga (4). Perciò i metaboliti O-metilati presentano concentrazioni plasmatiche più alte se confrontate a quelle delle catecolamine in caso di feocromocitoma (5, 6).

Le metanefrine possono essere misurate sia nel plasma che nelle urine come metaboliti liberi o dopo un pretrattamento di deconiugazione con un'idrolisi acida o con una conversione catalizzata da enzimi che trasformano i coniugati con solfato in metaboliti liberi (7). Numerosi studi hanno evidenziato come la misura delle concentrazioni di metanefrine libere nel plasma sia il parametro più sensibile per la diagnosi di feocromocitoma (7). La determinazione delle concentrazioni nelle urine temporizzate delle 24 ore delle metanefrine frazionate e delle catecolamine può essere riservata a pazienti a basso rischio, mentre l'analisi delle

Corrispondenza a: Manuela Lucchiari, Struttura Complessa Biochimica Clinica, Città della Salute e della Scienza di Torino, sede Molinette, Corso Bramante 88, 10126 Torino. Tel. 0116336317, E-mail manuela.lucchiari@gmail.com

Ricevuto: 29.01.2016

Revisionato: 04.04.2016

Accettato: 07.06.2016

Pubblicato on-line: 17.02.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.007

concentrazioni plasmatiche a quelli ad alto rischio, incluse le sindromi familiari endocrine sospette, per aumentare la possibilità di identificare la malattia (8). I metodi per determinare la concentrazione delle metanefrine sono meno soggetti a risultati falsi positivi dovuti a incrementi associati allo stress, compreso quello da prelievo venoso, e all'uso di farmaci che aumentano le catecolamine (ad es., levodopa, diuretici, antidepressivi triciclici, α - e β -bloccanti) (9).

Inizialmente, i metodi per la determinazione delle metanefrine plasmatiche erano basati su HPLC con rivelatore elettrochimico, approccio che richiede un elevato volume di campione, una procedura di estrazione e lunghe corse cromatografiche. In aggiunta, le interferenze dovute a molecole che co-eluiscono possono complicare l'interpretazione dei dati (10). Un metodo più veloce, meno indaginoso e più affidabile è quindi necessario per la determinazione di tali analiti. Più recentemente, sono stati sviluppati metodi immunoenzimatici, che confrontati con HPLC hanno però mostrato più basse sensibilità e specificità diagnostica dovute a legami non specifici e reattività crociate (11, 12). L'avvento della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) può risolvere molti problemi analitici, che influenzano la specificità e la sensibilità del dosaggio (13, 14). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di validare un metodo LC-MS/MS per il dosaggio delle concentrazioni di metanefrine plasmatiche.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati analizzati 638 campioni di plasma di pazienti afferenti al nostro laboratorio con richiesta di dosaggio delle metanefrine plasmatiche, rispettando i principi della Dichiarazione di Helsinki del 1975. I campioni, prelevati con provetta sottovuoto contenente EDTA_{K₂} come anticoagulante, sono stati consegnati in laboratorio entro 4 ore dal prelievo, trasportati a temperatura ambiente. All'arrivo in laboratorio, i campioni erano centrifugati a 4000 rpm per 5 min, aliquotati, conservati a -20 °C prima dell'analisi e analizzati con frequenza settimanale.

Metodi

Il metodo LC-MS/MS per il dosaggio delle metanefrine utilizza un sistema di cromatografia liquida a ultraprestazioni (Acquity UPLC H-Class Waters, Milford) interfacciato a uno spettrometro di massa accoppiato dotato di una sorgente di ionizzazione elettrospray ESI (Xevo-TQD, Waters).

Preparazione di standard e reagenti

A ogni seduta analitica è necessario rinnovare la preparazione degli standard di calibrazione, dello standard interno, dei reagenti per la purificazione e l'estrazione del campione in fase solida ("micro-solid

phase extraction", Oasis WCX μ Elution Plate30 μ m, Waters), le fasi mobili e le soluzioni di lavaggio per la corsa cromatografica.

Curva di calibrazione e controlli di qualità

A ogni seduta analitica, a partire da un'aliquota di standard di metanefrina e normetanefrina (Medical Isotopes Inc., Pelham) a concentrazione 5 mg/L in HCl 0,1 M, si prepara la curva di calibrazione. Questa prevede 8 livelli, da 250 μ g/L (calibratore 8) a 31 μ g/L (calibratore 1). A partire dal calibratore 8 si fanno diluizioni 1:2 scalari in HCl 0,1 M per ottenere i vari livelli di calibrazione. Nell'ultimo passaggio si esegue una diluizione 1:100 dei calibratori preparati in HCl 0,1 M con una soluzione diluita 1:20 costituita da tampone fosfato salino 0,1 M e albumina sierica bovina 0,1% (PBS/BSA) (Sigma Aldrich), per simulare la composizione del plasma.

Vengono utilizzati due controlli di qualità, un controllo normale (CN) e un controllo patologico (CP) forniti dalla ditta Chromsystems, in plasma umano liofilizzato da ricostituire con 5,0 mL di acqua deionizzata. Il CP viene diluito 1:3 con la soluzione PBS/BSA diluita 1:20 allo scopo di farne rientrare la concentrazione nella curva di calibrazione.

Standard interno

Gli standard interni utilizzati sono stati acquistati da Chemical Research 2000 Srl in polvere. Si sono preparate le soluzioni denominate "internal standard primary solution", sciogliendo in due matracci indipendenti 1 mg di d3-metanefrina e d3-normetanefrina in 1 mL di HCl 0,1M (stabile a -20 °C per 6 mesi). Dopo opportune diluizioni in HCl 0,1M e l'ultima in acqua si arriva a una concentrazione di 250 μ g/L preparata in un volume opportuno in funzione del numero di campioni da analizzare.

Preparazione del campione

Tutti i campioni di plasma erano scongelati a temperatura ambiente, miscelati e centrifugati a ~2000g per 5 min. In contenitori "tipo Eppendorf" erano miscelati 150 μ L di campione, calibratore e controllo con 150 μ L di standard interno preparato precedentemente. La miscela era mescolata mediante vortex e centrifugata a 13.000 rpm per 10 min.

I pozzetti della piastra μ Elution Plate Oasis WCX erano condizionati con 200 μ L di metanolo (CH₃OH) puro per ULC e successivamente equilibrati con 200 μ L di H₂O milliQ 18M Ω (prodotto da apparecchiatura Millipore), mediante pressione positiva di aria compressa, regolata mediante "positive pressure-96 processor" (Waters). Nei pozzetti della piastra erano caricati 200 μ L di campione preparato precedentemente (miscelato con standard interno) e applicata la pressione positiva di aria fino a completa eluizione. In seguito si eseguivano 3 lavaggi della μ Elution Plate Oasis WCX, rispettivamente, con 200 μ L di d-H₂O 18M Ω , 200 μ L di CH₃OH puro e, infine,

200 µL di acido formico (HCOOH) 98% puro per LC-MS (Sigma Aldrich) 0,1% in acetonitrile (CH₃CN). Successivamente, si sostituisce la piastra di raccolta degli scarti con quella di analisi (1 mL 96 well plate, Waters) e si procede con l'eluizione con 50 µL per due volte di HCOOH 2% in CH₃CN, applicando la pressione positiva di aria. Si utilizza una pressione che varia da 0 a 3 psi. La piastra viene coperta con un setto di gomma e posta nell'autocampionatore refrigerato a 8 °C per l'analisi cromatografica.

LC-MS/MS

Gli analiti sono separati su UPLC H-class con colonna Acquity, durante 10,5 min di corsa a gradiente e sono rivelati utilizzando un "multiple reaction monitoring" (MRM). Di seguito sono elencate le condizioni strumentali dell'UPLC utilizzate:

- volume iniettato: 30 µL,
- colonna: Waters Acquity UPLC BEH Amide 1,7 µm 2,1x50 mm,
- temperatura della colonna: 35,0 °C,
- durata corsa cromatografica: 10,5 min,
- temperatura autocampionatore: 10 °C,
- fasi mobili: fase A, composta da CH₃CN puro per ULC, e fase B, soluzione di 100 mM ammonio formiato 98% (Sigma Aldrich). La soluzione finale deve avere pH = 3. Il meccanismo di ritenzione in colonna "amide" è noto per essere dipendente dal pH della fase mobile e in questo saggio anche il pH del piccolo volume di eluato iniettato nella colonna può influenzare la forma del picco. Il pH nella fase mobile è cruciale per la prestazione del test e i risultati migliori si ottengono solo quando la fase mobile B è preparata fresca il giorno di utilizzo.

La soluzione di lavaggio esterno ("sample manager wash") dell'ago è costituita da 50% di CH₃CN puro per ULC e 50% di acqua MilliQ 8MΩ.

La soluzione di pulizia interna ("sample manager purge") dell'ago e di trasporto del campione è costituita da 95% di CH₃CN puro per ULC e 5% di acqua MilliQ 8MΩ.

La soluzione di pulizia del pistone ("seal wash") è costituita da 10% di CH₃OH puro per HPLC e 90% di acqua MilliQ 8MΩ.

Nella Tabella 1 sono indicate la durata, la velocità di flusso dell'eluente e la composizione delle fasi A e B interessate al gradiente, mentre le condizioni essenziali da rispettare per l'analisi in MS-MS sono riepilogate nella

Tabella 2. I valori di massa vanno utilizzati solo come punti di partenza da cui procedere all'ottimizzazione. La posizione esatta del segnale massimo varia leggermente da sistema a sistema e deve essere determinata nell'ambito della messa a punto dello strumento. L'acquisizione dei dati e il controllo del sistema di massa è permessa dall'utilizzo del software MassLynx™ v4.1, con il processamento automatico dei dati con TargetLynx Application Manager.

Analisi statistica

La retta di calibrazione è stata ricavata attraverso la regressione lineare dei minimi quadrati pesata utilizzando il "software" di gestione dell'analizzatore MassLynx™ v4.1 con il processamento automatico dei dati con TargetLynx Application Manager. Per il confronto tra metanefrine plasmatiche e metanefrine urinarie è stato utilizzato un approccio statistico di calcolo del grado di concordanza (MedCalc statistical software, v9.5.2.0). La concordanza è quantificata dal valore di k (k è uguale a 1 quando c'è una perfetta concordanza tra i valori, k è uguale a 0 quando non c'è concordanza tra i valori e k è negativo quando la concordanza è peggiore di quella ascrivibile al caso).

RISULTATI

Validazione analitica

La prima parte dello studio verteva sulla validazione del metodo secondo le linee guida dello "Scientific Working Group for Forensic Toxicology" (SWGTOX) (15). Si è proceduto calcolando il limite di quantificazione (LOQ), il limite di rivelabilità (LOD), la ripetibilità, la riproducibilità, il "carry-over" e l'effetto matrice.

Il LOD corrisponde alla concentrazione minima di

Tabella 1

Caratteristiche del metodo cromatografico utilizzato

Tempo (min)	Flusso (mL/min)	%Fase A CH ₃ CN 100%	%Fase B NH ₄ HCO ₂ 100 mM
0	0,2	98,0	2,0
3	0,2	65,0	35,0
4	0,2	98,0	2,0

Tabella 2

Caratteristiche del metodo in spettrometria di massa

	Polarità ESI	Transizioni MRM (m/z)	Voltaggio del cono (V)	Energia di collisione (V)	Tempo di ritenzione (min)	"Dwell time" (min)
MN	+	180→148	39	18	4,45	0,03
NMN	+	166→134	34	17	4,72	0,03
d3-MN	+	183→151	39	18	4,45	0,03
d3-NMN	+	169→137	34	17	4,72	0,03

ESI, "electrospray ionization"; MRM, "multiple reaction monitoring"; MN, metanefrina; NMN, normetanefrina.

analita distinguibile dal bianco. E' stato calcolato mediante l'analisi di 3 "pool" a concentrazione crescente di metanefrina e normetanefrina, analizzati in triplo in 3 sedute analitiche eseguite in giorni consecutivi. Sono stati calcolati media, DS e CV per ogni "pool". LOQ e LOD sono stati estrapolati dalla retta costruita con le concentrazioni medie e i CV, rispettivamente considerando un CV di 20% per il LOD e di 15% per il LOQ (Tabella 3).

Il "carry over" o effetto di trascinamento può essere un altro elemento di inaccuratezza qualitativa o quantitativa del risultato in un'analisi strumentale. Tale elemento è stato indagato facendo analizzare consecutivamente al livello alto di concentrazione il solvente di eluizione.

Come si osserva nella Figura 1, non si rileva alcun segnale imputabile all'effetto di trascinamento. I picchi che si vedono nei cromatogrammi sono a tempi di ritenzione (TR) diversi da quelli delle molecole ricercate (TR MN=4,45 min; TR NMN=4,72 min).

Tabella 3

Limite di rivelabilità (LOD) e limite di quantificazione (LOQ) calcolati per il dosaggio di metanefrina e normetanefrina plasmatiche

	Metanefrina	Normetanefrina
LOD	8 pM	66 pM
LOQ	26 pM	83 pM

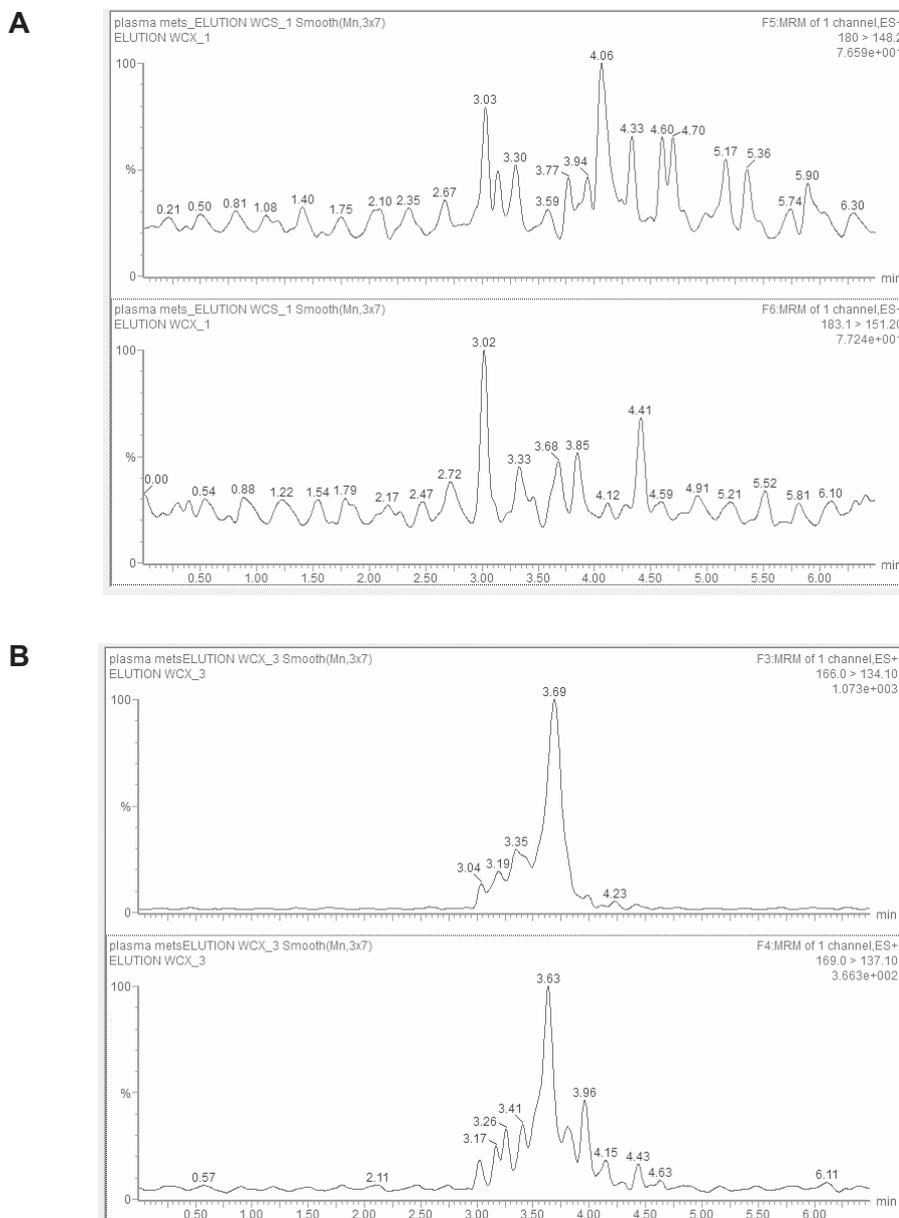


Figura 1
Cromatogramma della metanefrina (A) e della normetanefrina (B) plasmatica del solvente di eluizione.

Per le prove di imprecisione sono stati preparati due "pool" di plasma provenienti da prelievi ematici di soggetti afferenti agli ambulatori di Medicina ed Endocrinologia a concentrazioni note di metanefrina e normetanefrina (uno a concentrazione fisiologica e uno a concentrazione patologica). I "pool" erano suddivisi in aliquote e congelati. L'imprecisione intra-serie è stata valutata eseguendo 5 ripetizioni dei due "pool" all'interno della stessa seduta analitica. La precisione inter-serie è stata determinata su 5 ripetizioni dello stesso campione in 5 sedute analitiche condotte in giorni diversi. Per ogni "pool" sono stati calcolati media, DS e CV. La Tabella 4 mostra i risultati ottenuti.

La soppressione ionica è stata valutata preparando due set diversi di campioni. Il "neat standard" è uno standard chimico della sostanza nativa (privo di matrice plasmatica) a concentrazione pari al quarto calibratore della retta di calibrazione usata per quantificare le metanefrine plasmatiche. Esso non viene estratto con la colonna μ SPE, ma iniettato previa opportuna diluizione per ottenere la medesima concentrazione di quella dello stesso calibratore estratto mediante la μ Elution Plate Oasis WCX. Il bianco campione è costituito da un prelievo ematico di cui si è misurata una concentrazione non rilevabile strumentalmente, a cui è stata aggiunta una concentrazione di analita pari al quarto calibratore solo dopo l'estrazione μ SPE. La media delle aree dei due preparati è confrontata attraverso la formula: soppressione o "enhancement" ionica = (area media del "neat standard"/area media del bianco -1)*10.

Il valore di "enhancement" ottenuto per la metanefrina è pari a 26,6%, mentre nel caso della normetanefrina plasmatica è di 141,7%. Ne consegue che le concentrazioni dei campioni analizzati devono essere corrette per questo fattore. Tali fattori di correzione sono stati ricavati come media dall'analisi di 5 "pool" indipendenti, che rappresentavano la matrice plasmatica bianca.

Il recupero è stato calcolato confrontando un "pool" di plasma a concentrazioni di metanefrina e normetanefrina non rilevabili strumentalmente, a cui è stata aggiunta una concentrazione di analita nota prima dell'estrazione μ SPE (aggiunta "pre-spike"), con lo stesso "pool" di plasma a cui è stata aggiunta la medesima concentrazione di analita dopo l'estrazione μ SPE (aggiunta "post-spike"). Con il metodo oggetto del presente studio è stato calcolato un

recupero per metanefrina e normetanefrina plasmatica, rispettivamente, del 79% e del 66%.

A ogni seduta analitica sono utilizzati 8 standard a concentrazione scalare di ciascun analita (70 pM–9000 pM per metanefrina e 90 pM–11.500 pM per normetanefrina) e un bianco, sottoposti allo stesso pretrattamento del campione biologico. Esempi di retta di taratura sono riportati nella Figura 2.

Ogni standard di calibrazione era ripetuto in doppio. La concentrazione calcolata dei calibratori deve avere una differenza percentuale rispetto al valore nominale $\leq 15\%$; nel caso di calibratori a concentrazione vicina al LOQ, la differenza percentuale deve essere $\leq 20\%$. La curva di calibrazione può essere accettata se il 75% dei punti rispetta questa regola, viceversa è necessario ripetere la curva di calibrazione.

Validazione clinica

Il numero totale di campioni analizzati è stato 638, appartenenti a 498 pazienti, 263 di sesso femminile (53%) e 235 di sesso maschile (47%). L'età media della popolazione in esame era di 54 anni per le pazienti di sesso femminile, con un intervallo compreso tra 12 e 90 anni, e 51 anni per i pazienti di sesso maschile, con un intervallo compreso tra 9 e 85 anni. I campioni provenivano da reparti e centri di prelievo diversi (Figura 3). La maggior parte era prelevata a soggetti ambulatoriali o di altri ospedali. Questo ha reso difficile la valutazione clinica di alcuni pazienti e, quindi, sono stati analizzati solo 335 pazienti, di cui erano disponibili le notizie cliniche. La Figura 4 mostra la suddivisione di questi campioni per patologia. In "Altre patologie" sono compresi tumori endocrini, adenomi e incidentalomi surrenali non secernenti e pazienti con sindrome di Cushing. Nel gruppo "feocromocitoma/paraganglioma" sono inclusi pazienti che al momento del prelievo erano sospetti per queste condizioni cliniche e campioni di controllo di pazienti già diagnosticati in passato.

Di questi pazienti sono stati confrontati i valori medi delle metanefrine plasmatiche e urinarie. Nel caso delle metanefrine plasmatiche (Figura 5), si può notare che il valore medio della normetanefrina è più alto nella popolazione "feocromocitoma/paraganglioma" (3063 pM), mentre per tutte le altre popolazioni il valore medio risulta al di sotto del cut-off (600 pM). Per la metanefrina

Tabella 4

Imprecisione del metodo valutato

	Concentrazione fisiologica				Concentrazione patologica			
	Metanefrina		Normetanefrina		Metanefrina		Normetanefrina	
	Intra-serie	Inter-serie	Intra-serie	Inter-serie	Intra-serie	Inter-serie	Intra-serie	Inter-serie
Minimo (pM)	104,3	74,3	408,5	296,4	802,6	655,9	1685,4	1564,4
Massimo (pM)	105,1	111,8	494,5	469,2	885,4	900,8	2132,6	2420,5
Media (pM)	110,2	97,0	443,5	399,7	857,7	830,5	1829,0	2003,2
DS (pM)	5,6	15,4	36,3	66,4	33,6	99,2	192,9	323,5
CV (%)	5,1	15,9	8,2	16,6	3,9	11,9	10,5	16,1

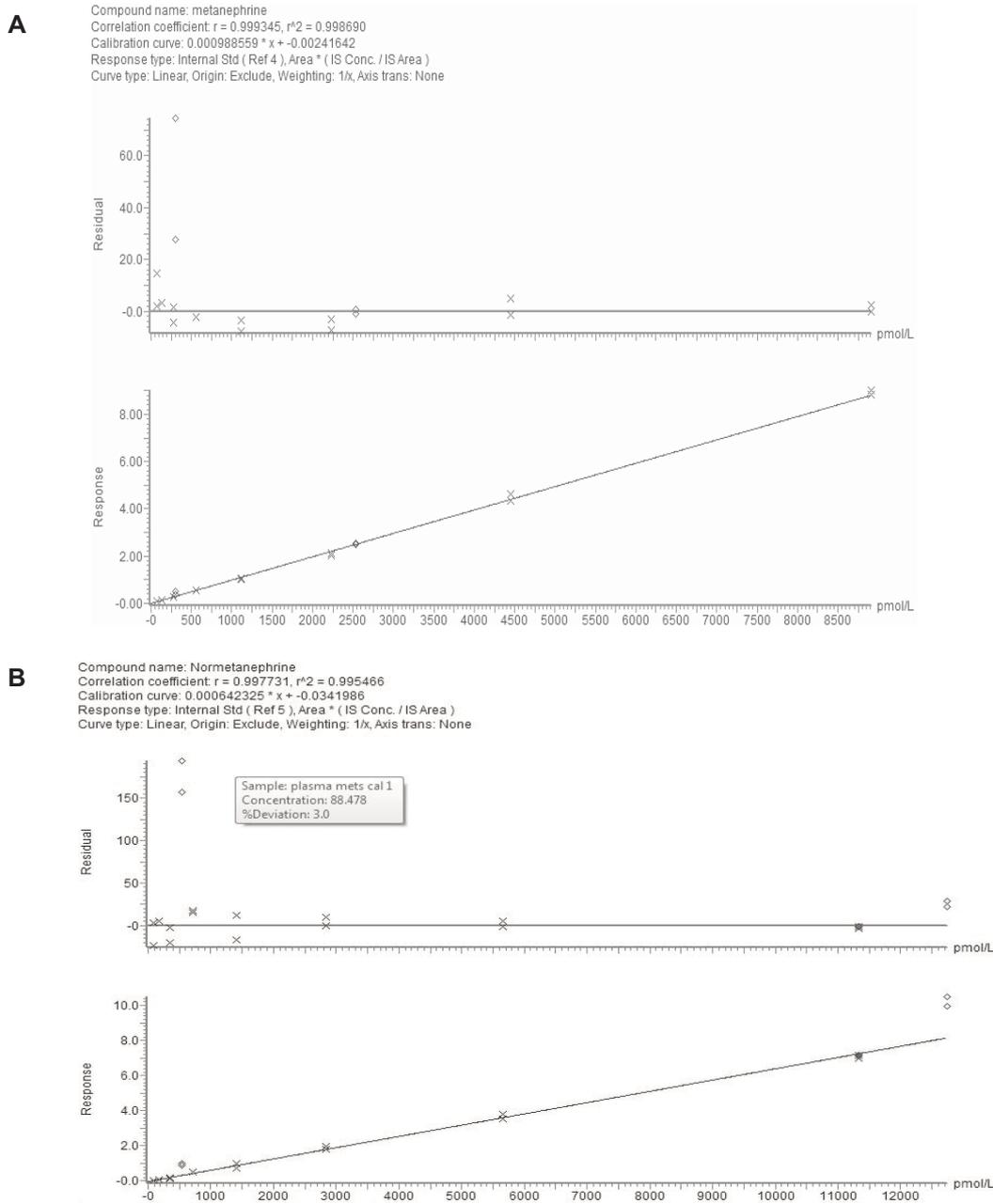


Figura 2
 Rette di taratura della della metanefrina (A) e della normetanefrina (B).

plasmatica, il valore medio della popolazione con feocromocitoma supera di poco il cut-off (300 pM), avendo un valore medio uguale a 330 pM (Figura 5). Quando si operi la distinzione tra pazienti che hanno eseguito l'esame come controllo, essendo stati in passato operati per feocromocitoma, e pazienti positivi al momento dell'esame, si nota che il valore medio della metanefrina plasmatica passa da 330 pM a 507 pM e quello della normetanefrina plasmatica sale a 5500 pM (Figura 6).

I risultati ottenuti con la determinazione delle

metanefrine plasmatiche sono stati messi a confronto con quelli misurati per le metanefrine urinarie. La normetanefrina urinaria è molto elevata per i pazienti del gruppo "feocromocitoma/paraganglioma", ma anche per pazienti affetti da iperaldosteronismo e ipertensione arteriosa essenziale si hanno valori medi superiori al cut-off (354 µg/d), rispettivamente di 416 µg/d e 438 µg/d. Per quanto riguarda la metanefrina urinaria, tutte le popolazioni presentano un valore medio più basso del cut-off (298 µg/d), rispettivamente 283 µg/d per i pazienti del gruppo "feocromocitoma/paraganglioma", 115 µg/d

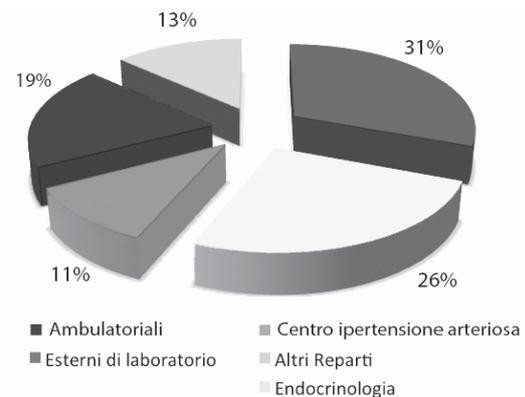


Figura 3
Distribuzione della provenienza dei campioni utilizzati nello studio.

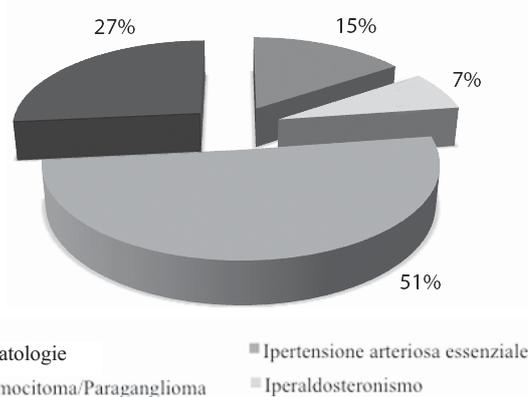


Figura 4
Distribuzione della popolazione analizzata per patologia.

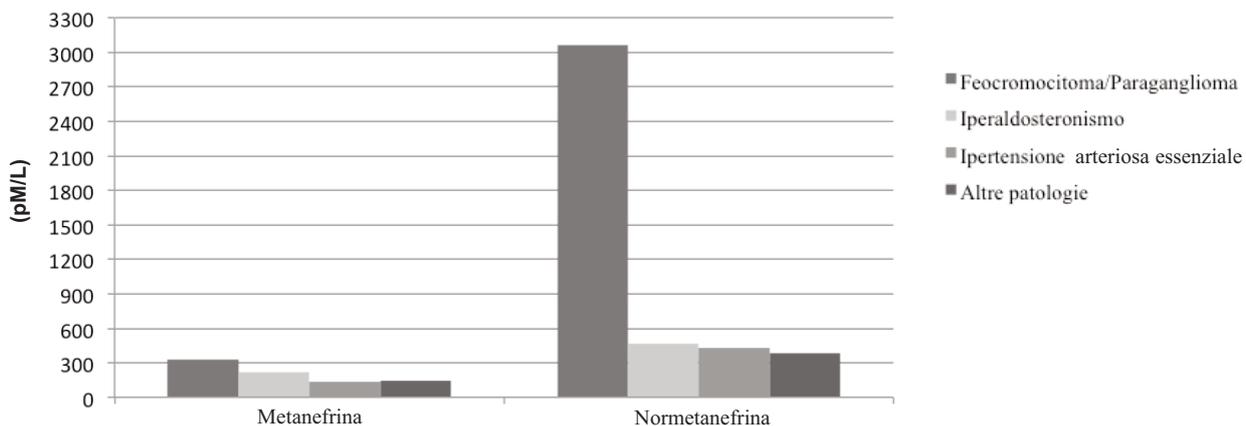


Figura 5
Valori medi delle concentrazioni plasmatiche di metanefrine in relazione alla patologia nei soggetti studiati.

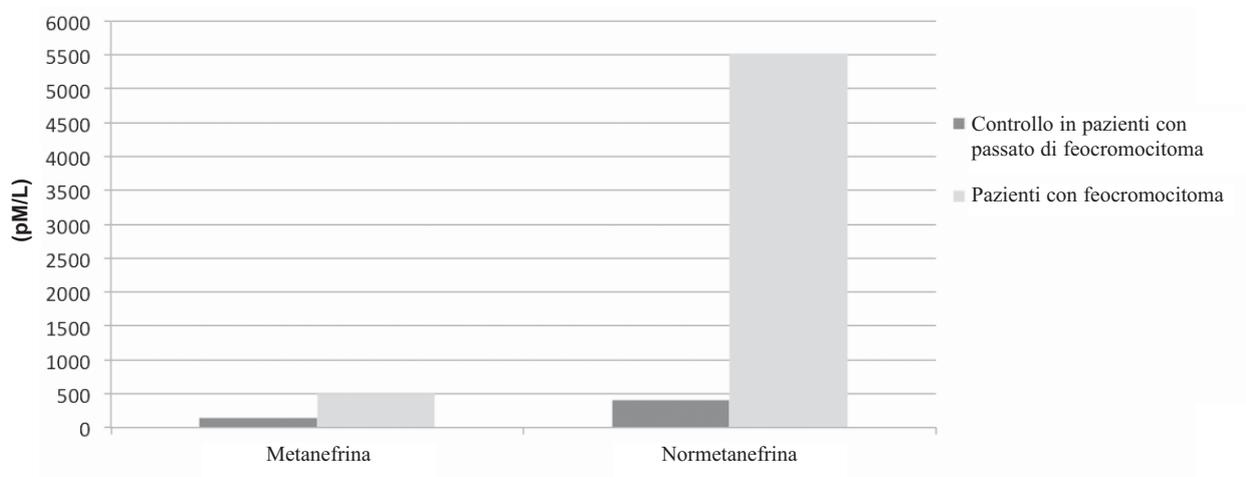
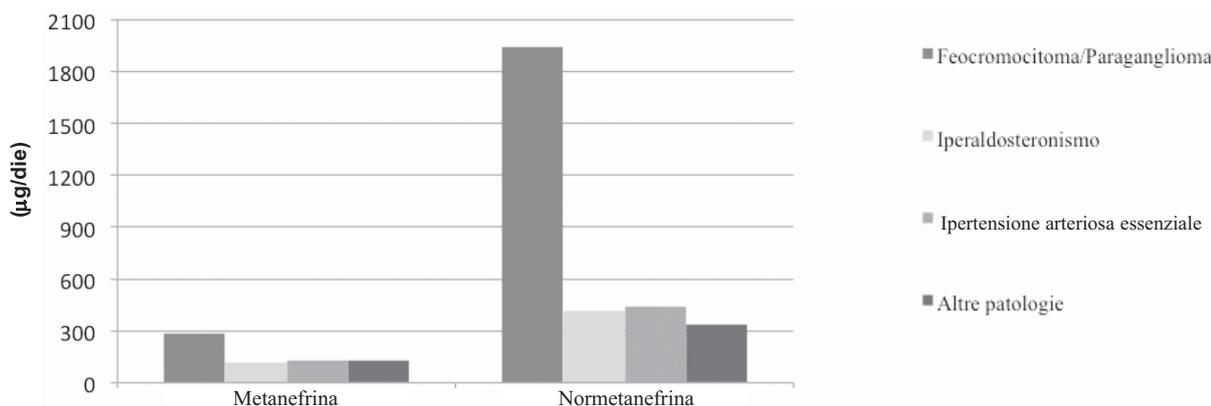


Figura 6
Valori medi delle concentrazioni plasmatiche di metanefrine nel gruppo feocromocitoma/paraganglioma.

**Figura 7**

Valori medi delle concentrazioni urinarie di metanefrine in relazione alla patologia nei soggetti studiati.

Tabella 5

Concordanza tra metanefrina plasmatica e urinaria (i risultati sono espressi come negativi e positivi sulla base dei limiti soglia)

Metanefrina		Plasmatica (pM)		
		Negativi	Positivi	
Urinaria (µg/d)	Negativi	206	18	224 (94,9%)
	Postivi	2	12	12 (5,1%)
		208 (88,1%)	28 (11,9%)	236
"Weighted kappa"				0,462

Tabella 6

Concordanza tra normetanefrina plasmatica e urinaria (i risultati sono espressi come negativi e positivi sulla base dei limiti soglia)

Normetanefrina		Plasmatica (pM)		
		Negativi	Positivi	
Urinaria (µg/d)	Negativi	131	12	143 (60,6 %)
	Postivi	58	35	93 (39,4%)
		189 (80,1%)	47 (19,9 %)	236
"Weighted kappa"				0,32

per i pazienti con iperaldosteronismo, 126 µg/d per i pazienti con ipertensione arteriosa essenziale e 128 µg/d per pazienti con altre patologie (Figura 7).

Come si può evincere dal valore di k, non c'è una buona concordanza tra metanefrina plasmatica e metanefrina urinaria (Tabella 5). 18 campioni risultati positivi per la metanefrina plasmatica sono invece risultati negativi per quella urinaria, mentre solo due valori positivi per la metanefrina urinaria sono risultati negativi per quella plasmatica. Anche nel caso della normetanefrina (Tabella 6) non si ha una buona concordanza; infatti, si possono notare 58 casi in cui la normetanefrina urinaria è risultata positiva, mentre quella plasmatica è negativa.

DISCUSSIONE

La determinazione dei metaboliti delle catecolamine O-metilati (metanefrine) offre la migliore accuratezza diagnostica per la diagnosi biochimica di feocromocitoma. Poiché la maggior parte dell'O-metilazione avviene all'interno delle cellule del tumore che produce catecolamine, la continua produzione di metanefrine è indipendente dal rilascio estremamente variabile di catecolamine in pazienti con feocromocitoma (1). Sebbene la sensibilità diagnostica delle metanefrine urinarie non coniugate sia molto simile a quella delle metanefrine plasmatiche (96 vs. 98%), la specificità diagnostica di quelle urinarie è significativamente inferiore (69% vs. 89%) (16). In

generale, ci sono molti vantaggi connessi con la misura delle metanefrine plasmatiche rispetto a quelle urinarie; infatti, la loro misura risulta poco influenzata dalla stimolazione simpatico-adrenenergica, si evita la raccolta temporizzata delle urine e si ha maggiore sensibilità diagnostica rispetto ad altri parametri biochimici (4, 17). Tuttavia, il loro dosaggio presenta notevoli difficoltà a causa delle concentrazioni molto basse nel plasma.

Il metodo validato in questo lavoro è soddisfacente per la misura delle metanefrine plasmatiche in pazienti con feocromocitoma, in quanto si osserva un'ottima linearità sia per la metanefrina che per la normetanefrina plasmatica. Il metodo è risultato riproducibile e ripetibile con CV, sia per le prove inter-serie che per quelle intra-serie, <20%. LOD e LOQ, sia nel caso della metanefrina che della normetanefrina plasmatica, sono risultati sufficientemente bassi per l'impiego clinico.

Questo metodo è ancora indaginoso, in quanto completamente manuale, e attualmente non è ancora distribuito in commercio un kit pronto all'uso. Giornalmente l'operatore deve ripreparare la curva di calibrazione ottenuta con una serie di diluizioni, lo standard interno, le fasi mobili e i solventi di lavaggio per lo strumento e i solventi per l'estrazione in μ SPE e questo richiede particolare attenzione, specialmente nel caso di estrazione di molti campioni nella stessa seduta. La soggettività e la variabilità degli operatori è un fattore ancora da valutare estesamente. L'utilizzo di un preparatore automatico faciliterebbe il lavoro dell'operatore ed escluderebbe errori di tipo casuale.

Dal momento che il feocromocitoma è un tumore molto raro, il numero di pazienti analizzati è limitato. Nonostante ciò, si è osservata una buona correlazione tra le metanefrine plasmatiche e questa patologia; infatti, i pazienti che al momento dell'analisi erano affetti da feocromocitoma hanno mostrato valori medi di metanefrina e normetanefrina plasmatiche nettamente superiori (nel primo caso di due volte, mentre nel secondo caso di ~9 volte) del limite superiore di riferimento (300 pM per la metanefrina e 600 pM per la normetanefrina). Questo permette di poter nettamente distinguere un paziente affetto da feocromocitoma da pazienti con altre cause (anche secondarie) di ipertensione. Anche le metanefrine urinarie sono elevate in caso di feocromocitoma, ma si è notato che la normetanefrina urinaria è alta anche negli altri gruppi. In particolar modo, si è evidenziato che in un numero rilevante di dosaggi (25%) la normetanefrina urinaria è risultata superiore alla soglia, mentre quella plasmatica era al disotto. Valutando la clinica di tali pazienti, si è notato che non erano affetti da feocromocitoma, ma erano portatori di adenomi o incidentalomi surrenali.

L'analisi sul plasma presenta minori criticità rispetto a quella condotta sulla raccolta urinaria delle 24 ore. Infatti, quest'ultimo campione potrebbe non risultare idoneo in caso di poliuria (risulterebbe troppo diluito) o anuria, o la raccolta potrebbe non contenere tutte le frazioni di urina emesse nelle 24 ore, e, infine, si potrebbe non avere la corretta misura del volume finale.

In conclusione, il dosaggio plasmatico riflette più da vicino l'ipersecrezione di catecolamine, che caratterizza il feocromocitoma, e si può sottolineare che il metodo da noi validato presenta molti vantaggi, tra cui l'efficacia diagnostica, la specificità e la sensibilità analitica, a spese però di alcuni svantaggi, come l'elevata manualità per la preparazione dei calibratori e della fase mobile e la purificazione/ concentrazione dell'analita dalla matrice biologica. Inoltre, l'analisi dei dati richiede una particolare esperienza in campo di spettrometria di massa e ancora non sono disponibili VEQ ampiamente diffuse per le metanefrine plasmatiche. In futuro, attraverso una collaborazione con i fornitori dei reagenti e dello strumento, si potrebbe allestire un kit pronto all'uso per facilitare l'operatore, integrando anche una piattaforma per l'automatizzazione dell'estrazione del campione. Saranno infine necessari ulteriori studi per poter determinare i valori di riferimento della popolazione afferente al nostro ospedale e per poter valutare il dosaggio di metanefrine plasmatiche come possibile esame di screening per ipertensione secondaria in uno studio prospettico al momento della prima diagnosi.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. de Jong WHA, Graham KS, van der Molen JC, et al. Plasma free metanephrine measurement using automated online solid-phase extraction HPLC–tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2007;53:1684-93.
2. Omura M, Saito J, Yamaguchi K, et al. Prospective study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting an outpatient clinic in Japan. *Hypertens Res* 2004;27:193-202.
3. Eisenhofer G, Timmers HJ, Lenders JW, et al. Age at diagnosis of pheochromocytoma differs according to catecholamine phenotype and tumor location. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:375-84.
4. Lenders JW, Pacak K, Walther MM, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma, which test is better? *JAMA* 2002;287:1427-34.
5. Eisenhofer G, Huynh TT, Hiroi M, et al. Understanding catecholamine metabolism as a guide to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma. *Rev Endocr Metab Disord* 2001;2:297-311.
6. Tsirlin A, Oo Y, Sharma R, et al. Pheochromocytoma: a review. *Maturitas* 2014;77:229-38.
7. Pamporaki C, Därr R, Bursztyń M, et al. Plasma-free vs. deconjugated metanephrines for diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Endocrinol* 2013;79:476-83.
8. Sawka AM, Jaeschke R, Singh RJ, et al. A comparison of biochemical test for pheochromocytoma measurement of fractionated plasma metanephrines compared with the combination of 24-hour urinary metanephrines and catecholamines. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:553-8.
9. Eisenhofer G, Goldstein DS, Walther MM, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true from false positive results. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2656-66.
10. Lagerstedt S, O'Kane DJ, Singh R. Measurement of plasma free metanephrine and normetanephrine by liquid

- chromatography–tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Chem* 2004;50:603-11.
11. Manz B, Kuper M, Bootink E, et al. Development of enantioselective immunoassay for free plasma metanephrines. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1018:582-7.
 12. Lenz T, Zorner J, Kirchmaier C, et al. Multicenter study on the diagnostic value of a new RIA for the detection of free plasma metanephrines in the work-up for pheochromocytoma. *Ann NY Acad Sci* 2006;1073:358-73.
 13. Taylor R, Singh RJ. Validation of liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the analysis of urinary conjugated metanephrine and normetanephrine for screening of pheochromocytoma. *Clin Chem* 2002;48:533-9.
 14. Perry GC, Sawka AM, Singh R, et al. The diagnostic efficacy of urinary fractionated metanephrines measured by tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Endocrinol* 2007;66:703-8.
 15. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Standard practices for method validation in forensic toxicology, SWGTOX Doc 003 Revision 1, Published May 20, 2013.
 16. Peaston RT, Graham KS, Chambers E, et al. Performance of plasma free metanephrines measured by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Chim Acta* 2010;411:546-52.
 17. Eisenhofer G, Siegert G, Kotzerke J, et al. Current progress and future challenges in the biochemical diagnosis and treatment of pheochromocytoma and paragangliomas. *Horm Metab Res* 2008;40:329-37.