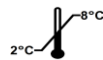

Instructions for use
Nephrines Plasma ELISA **Fast Track**

REF

KAPL10-1400



IVD

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of free Metanephrine and free Normetanephrine in plasma.

Related Products:

	2-MET Plasma RIA ^{Fast Track}
Metanephrine Plasma ELISA ^{Fast Track}	Metanephrine Plasma RIA ^{Fast Track}
Normetanephrine Plasma ELISA ^{Fast Track}	Normetanephrine Plasma RIA ^{Fast Track}

Alternatively the assay can also be run automatically on an ELISA processor such as the Gemini instrument from Stratec Biomedical. The Gemini protocol is available upon request.

Metanephrine (Metadrenaline) and Normetanephrine (Normetadrenaline) are first extracted using an ion exchange matrix followed by an acylation process.

The subsequent competitive ELISA uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The acylated standards, controls and samples compete with the solid phase bound analytes for a fixed number of antibody binding sites. After the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antibody complexes are removed by washing. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate. The reaction is monitored at 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standards.



The antibodies used in this test kit only recognise the biologically relevant L-forms of Metanephrines. Commercially available synthetic Normetanephrine or Metanephrine is always a mixture of the D- and L-form. The ratio between both forms differs widely from lot to lot. This has important implications if synthetic Metanephrines are used to enrich native samples. As only about 50% of the synthetic Metanephrines - the L-portion - will be detected by use of this kit, spiked samples will be underestimated. Therefore native samples containing solely the L-form should be used.

1.2 Clinical application

Metanephrine and Normetanephrine are the metabolites of the catecholamines Epinephrine and Norepinephrine, respectively. Cells derived from neuroendocrine tumors (e.g. pheochromocytoma) are known to produce catecholamines, which are secreted episodically via vesicles into the blood stream. But beside this, a small portion of the catecholamines is metabolized inside the cells to the corresponding catecholamines metabolites – namely Metanephrine, Normetanephrine and 3-Methoxytyramine – which are secreted at low levels continuously into the blood stream.

Recent studies and publications have shown that the quantification of these plasma free Metanephrine and plasma free Normetanephrine is the most accurate biochemical marker for the clinical diagnosis of pheochromocytoma and follow-up of pheochromocytoma patients.

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone, even if all test results are in agreement with the items as under point “Procedural cautions, guidelines and warnings”. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of the patient.

Only in cases where the laboratory results are in an acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient, it can be used for therapeutic consequences.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations

2.1 Procedural cautions, guidelines and warnings

- (1) This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and has to be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for a certain type of sample as indicated in *Intended Use* (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) Reagents of this kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- (4) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (5) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.

- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (8) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided. Microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up.
- (9) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (10) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.
- (11) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (12) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (13) A standard curve must be established for each run.
- (14) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report.
- (15) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (16) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (17) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them.
- (18) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheet (MSDS). The Material Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (19) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (20) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence (e.g. medication before a scheduled surgery) but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
- (21) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed according to national regulations.

2.2 Limitations

Any inappropriate handling of samples or modification of this test might influence the results.

2.2.1 Interfering substances

Samples containing precipitates or fibrin strands or which are haemolytic or lipemic might cause inaccurate results.

2.2.2 Drug interferences

Please refer to point "Sample collection and storage".

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

Store the unopened reagents at 2 - 8 °C until expiration date. Do not use components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened, the reagents are stable for 1 month when stored at 2 - 8 °C. Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly with desiccant again.

4. Materials

4.1 Content of the kit

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Ready to use
Content:	Adhesive Foils in a resealable pouch	
Volume:	2 x 4 foils	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate - Concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	2 x 20 ml/vial, light purple cap	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate - Ready to use
Content:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	2 x 12 ml/vial, red cap	

- BA E-0055** **SUBSTRATE** **Substrate** - Ready to use
 Content: Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide
 Volume: 2 x 12 ml/vial, black cap
- BA E-0080** **STOP-SOLN** **Stop Solution** - Ready to use
 Content: 0.25 M sulfuric acid
 Volume: 2 x 12 ml/vial, light grey cap
- BA E-0131** **ADR MN** **Metanephrine Microtiter Strips** - Ready to use
 Content: 1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable blue pouch with desiccant
- BA E-0231** **NAD NMN** **Normetanephrine Microtiter Strips** - Ready to use
 Content: 1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable yellow pouch with desiccant
- BA E-8110** **MN-AS** **Metanephrine Antiserum** - Ready to use
 Content: Rabbit anti- Metanephrine antibody, blue coloured
 Volume: 1 x 6 ml/vial, blue cap
- BA E-8210** **NMN-AS** **Normetanephrine Antiserum** - Ready to use
 Content: Rabbit anti- Normetanephrine antibody, yellow coloured
 Volume: 1 x 6 ml/vial, yellow cap

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration pg/ml		Concentration pmol/l		Volume/ Vial
			MN	NMN	MN	NMN	
BA E-8301	STANDARD A	white	0	0	0	0	4 ml
BA E-8302	STANDARD B	light yellow	36	72	183	393	4 ml
BA E-8303	STANDARD C	orange	120	240	608	1 310	4 ml
BA E-8304	STANDARD D	dark blue	360	720	1 825	3 931	4 ml
BA E-8305	STANDARD E	light grey	1 200	2 400	6 084	13 104	4 ml
BA E-8306	STANDARD F	black	3 600	7 200	18 252	39 312	4 ml
BA E-8351	CONTROL 1	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!				4 ml
BA E-8352	CONTROL 2	dark red	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!				4 ml

Conversion: Metanephrine (pg/ml) x 5.07 = Metanephrine (pmol/l)
 Normetanephrine (pg/ml) x 5.46 = Normetanephrine (pmol/l)
 Content: Acidic buffer with non-mercury stabilizer, spiked with a defined quantity of Metanephrine and Normetanephrine

- BA E-8327** **ADJUST-BUFF** **Adjustment Buffer** - Ready to use
 Content: Tris-Buffer
 Volume: 1 x 10 ml/vial, yellow cap
- BA R-8313** **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** - Ready to use
 Content: 25% organic solvent
 Volume: 1 x 30 ml/vial, orange cap

- BA R-8312** **ACYL-CONC** **Acylation Concentrate** - Concentrated
 Content: Acylation reagent in DMSO
 Volume: 1 x 1.5 ml/vial, dark grey cap

Hazards identification:



H302 Harmful if swallowed.

- BA R-8318** **EXTRACT-PLATE 96** **Extraction Plate** - Ready to use
 Content: 1 x 96 well plate, precoated with ion-exchanger in a resealable pouch
- BA R-8325** **CLEAN-CONC 25x** **Cleaning Concentrate** - Concentrated 25x
 Content: Buffer with sodium acetate
 Volume: 1 x 20 ml/vial, brown cap
- BA R-8326** **ELUTION-BUFF** **Elution Buffer** - Ready to use
 Content: 0.1 M Sodium hydroxide, dark purple coloured
 Volume: 1 x 14 ml/vial, dark green cap
- BA R-8828** **EQUA-REAG** **Equalizing-Reagent** - Ready to use
 Content: Human serum, negative for HIV I/II, HBsAg and HCV
 Volume: 1 x 8 ml/vial, white cap

4.2 Additional materials and equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 20 - 350 µl; 3 ml
- Microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 - 650 nm
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Vortex mixer

5. Sample collection and storage

Medications like Serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors, tricyclic antidepressants, MAO inhibitors, antihypertensive drugs and L-DOPA can influence Metanephrine and Normetanephrine level. People who are taking such medication should consult with their doctor before specimen collection.

Sympathomimetic agents, sport and smoking can also influence Metanephrine and Normetanephrine level.

Alcohol and caffeinated drinks should be avoided the day before and including the day of sample collection.

EDTA- or Heparin-Plasma

Whole blood should be collected into centrifuge tubes (Monovette™ or Vacuette™) containing EDTA or heparin as anti-coagulant and centrifuged (according to manufacturer's instructions) immediately after collection.

Haemolytic and lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: up to 6 hours at 2 - 8 °C, for longer period (up to 6 months) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.


6. Test procedure

The ELISA can be run using an overnight incubation without shaking (results within approx. 24 hours) or alternatively as a fast version with shortened antiserum incubation times with shaking (results within approx. 6 hours).


Allow all reagents to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the Extraction Plate and microwell plates (microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up). Duplicate determinations are recommended.

The binding of the antibodies, the enzyme conjugates, and the activity of the enzyme used are temperature dependent, the absorption values may vary if a thermostat is not used. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. The absorption values also depend on the incubation times. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20 - 25 °C.

6.3 Metanephrine ELISA

1.	Pipette 25 µl of Adjustment Buffer into all wells of the Metanephrine Microtiter Strips .
2.	Pipette 50 µl of the extracted standards, controls and samples into the respective wells. <i>Please hold the Extraction Plate at a slight angle in order to facilitate this pipetting step.</i>
3.	Preparation of Acylation Solution : Pipette 80 µl Acylation Reagent Concentrate (BA R-8312) to 3 ml water (deionized, distilled, or ultra-pure) and mix thoroughly.
4.	Pipette 25 µl of the freshly prepared Acylation Solution into all wells.
5.	Incubate for 15 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
6.	Pipette 50 µl of the Metanephrine Antiserum into all wells.
7.	Cover the plate with Adhesive Foil , shake for 1 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker and incubate for 15 - 20 h (overnight) at 2 – 8 °C without shaking. <i>Alternatively incubate for 2 h at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).</i>
8.	Remove the foil. Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 x by adding 300 µl of Wash Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
9.	Pipette 100 µl of the Enzyme Conjugate into all wells.
10.	Incubate for 30 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
11.	Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 x by adding 300 µl of Wash Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
12.	Pipette 100 µl of the Substrate into all wells and incubate for 20 - 30 min at RT (20 – 25 °C) on a  shaker (approx. 600 rpm). Avoid exposure to direct sunlight!
13.	Add 100 µl of the Stop Solution to all wells and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
14.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 450 nm (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

6.4 Normetanephrine ELISA

1.	Pipette 25 µl of Adjustment Buffer into all wells of the Normetanephrine Microtiter Strips .
2.	Pipette 25 µl of the extracted standards, controls and samples into the respective wells. <i>Please hold the Extraction Plate at a slight angle in order to facilitate this pipetting step.</i>
3.	Preparation of Acylation Solution : Pipette 80 µl Acylation Reagent Concentrate (BA R-8312) to 3 ml water (deionized, distilled, or ultra-pure) and mix thoroughly.
4.	Pipette 25 µl of the freshly prepared Acylation Solution into all wells.
5.	Incubate for 15 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
6.	Pipette 50 µl of the Normetanephrine Antiserum into all wells.
7.	Cover the plate with Adhesive Foil , shake for 1 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker and incubate for 15 - 20 h (overnight) at 2 – 8 °C without shaking. <i>Alternatively incubate for 2 h at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).</i>
8.	Remove the foil. Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 x by adding 300 µl of Wash Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
9.	Pipette 100 µl of the Enzyme Conjugate into all wells.
10.	Incubate for 30 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
11.	Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 x by adding 300 µl of Wash Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
12.	Pipette 100 µl of the Substrate into all wells and incubate for 20 - 30 min at RT (20 – 25 °C) on a  shaker (approx. 600 rpm). Avoid exposure to direct sunlight!
13.	Add 100 µl of the Stop Solution to all wells and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
14.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 450 nm (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

7. Calculation of results

Measuring range (overnight ELISA)	Metanephrine	Normetanephrine
	15.1 – 3 600 pg/ml	22.8 – 7 200 pg/ml

The standard curve is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis). Use a non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).



This assay is a competitive assay. This means: the OD-values are decreasing with increasing concentrations of the analyte. OD-values found below the standard curve correspond to high concentrations of the analyte in the sample and have to be reported as being positive.

The concentrations of the **samples** and **controls** can be read directly from the standard curve.

Samples found with concentrations higher than the highest standard (Standard F) should be diluted accordingly with the included Equalizing Reagent and have to be re-assayed.

Conversion

Metanephrine (pg/ml) x 5.07 = Metanephrine (pmol/l)

Normetanephrine (pg/ml) x 5.46 = Normetanephrine (pmol/l)

Expected reference values

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference values.

The expected reference values indicated below are based on method comparison studies to LC-MS/MS ⁽¹⁾ with blood samples taken in the sitting position.

Metanephrine	Normetanephrine
< 65 pg/ml	< 196 pg/ml

For the interpretation of the results, a grey area has to be considered. This grey area does not depend on the methodology used and is reflected in a slight to moderate increase in Metanephrine and Normetanephrine up to 4 times the upper cut-off (Eisenhofer et al. 2003). Approx. 20 % of the tumors are found in this grey area, especially in the case of the Hereditary Syndrome, incidental tumors and in sporadic cases of Pheochromocytomas with a diameter less than 1 cm.

In case of a result in the grey area, it is recommended to collect a new sample together with an anamnesis concerning especially influences like the medication and age of the patient.

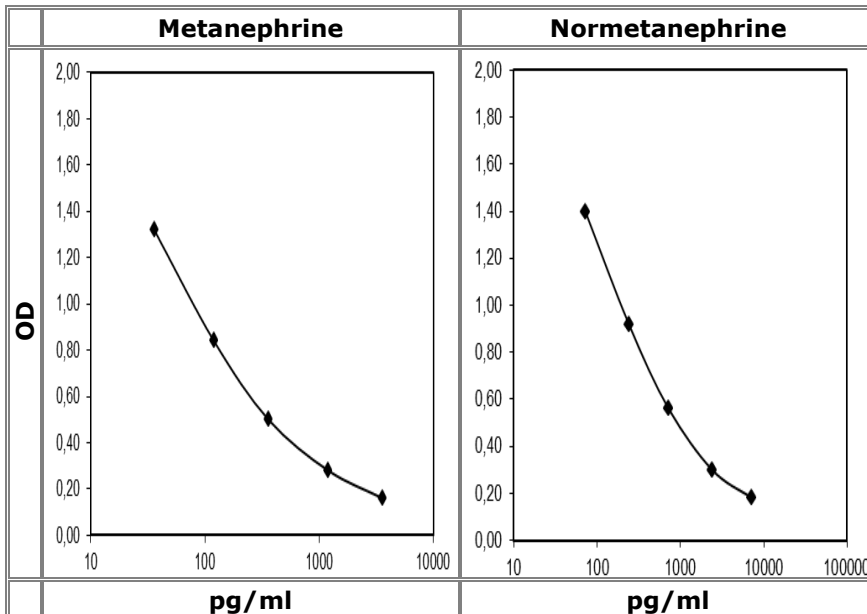
7.1 Quality control

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. The kit or other commercial controls should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are indicated in the QC-Report.

7.2 Typical standard curves



Examples, do not use for calculation!



8. Assay characteristics (overnight ELISA)

Analytical Sensitivity		Metanephrine	Normetanephrine
	LOD (pg/ml)	14.9	17.9
	LOQ (pg/ml)	15.1	22.8

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)	
		Metanephrine	Normetanephrine
	Derivatized Metanephrine	100	0.72
Derivatized Normetanephrine	0.05	100	
3-Methoxytyramin	< 0.01	6.5*	
Adrenaline	< 0.01	< 0.01	
Noradrenaline	< 0.01	< 0.01	
Dopamin	< 0.01	< 0.01	
Vanillic mandelic acid	< 0.01	< 0.01	
Homovanillic acid	< 0.01	< 0.01	
L-DOPA	< 0.01	< 0.01	
L-Tyrosin	< 0.01	< 0.01	
Tyramine	< 0.01	< 0.01	
Normetanephrine	< 0.01	< 0.01	
Acetaminophen	< 0.01	< 0.01	

*Normetanephrine concentrations are not influenced by 3-Methoxytyramine in case of normal 3-Methoxytyramine concentrations. Only very high 3-Methoxytyramine concentrations found in rare cases of exclusively dopamine secreting tumours can cause false positive results.

Precision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Sample	Mean (pg/ml)	CV (%)		Sample	Mean (pg/ml)	CV (%)
Metanephrine	1	66.3	11.4	Metanephrine	1	67.8	17.6
	2	122	13.5		2	134	12.7
	3	308	10.6		3	319	11.0
	4	783	9.2		4	847	7.5
Normetanephrine	1	149	9.5	Normetanephrine	1	156	10.6
	2	282	9.1		2	287	5.0
	3	734	8.2		3	769	5.1
	4	1 956	10.5		4	1 949	5.9

Linearity		Serial dilution up to	Mean (%)	Range (%)
	Metanephrine	1:64	107	101 - 124
	Normetanephrine	1:64	98	92 - 102

Recovery		Mean (%)	Range (%)
	Metanephrine	88	80 - 99
	Normetanephrine	109	105 - 114

Method Comparison: ELISA vs. LC-MS/MS ⁽¹⁾	Metanephrine	$y=0.91x + 1.8; r^2 = 0.96; n = 46$
	Normetanephrine	$y=0.93x + 13; r^2 = 0.99; n = 48$













9. References/Literature

- (1) De Jong et al. Plasma free metanephrine measurement using automated online solid phase extraction HPLC-Tandem mass spectrometry. Clin Chem, 53(9): 1684-1693 (2007)
- (2) Eisenhofer et al. Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. Clin Chem, 60:1486-1499 (2014)
- (3) Eisenhofer et al. Plasma metadrenalines: Do they provide useful information about sympatho-adrenal function and catecholamine metabolism? Clin Sci (Lond),88:533-542 (1995)
- (4) Berkel et al. Diagnosis of endocrine disease: Biochemical diagnosis of phaeochromocytoma and paraganglioma. Eur J Endocrinol, 170: R109-R119

- (5) Manz et al. Development of enantioselective immunoassays for free plasma metanephrines. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1018:582-587 (2004)
- (6) De Jong et al. Dietary Influences on Plasma and Urinary Metanephrines: Implications for Diagnosis of Catecholamine-Producing Tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(8):2841-2849 (2009)
- (7) Deutschbein et al. Influences of Various Confounding Variable and Storage Conditions on Metanephrine and Normetanephrine Levels in Plasma. *Clin Endocrinol*, 72(2):153-160 (2010)
- (8) Eisenhofer et al. Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma: How to Distinguish True- from False-Positive Test Results. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(6):2656-2666 (2003)

 **For updated literature or any other information please contact your local supplier.**

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		For research use only!

1. Einleitung**1.1 Verwendungszweck und Testprinzip**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von freiem Metanephrin und freiem Normetanephrin in Plasma.

Artverwandte Produkte:

	2-MET Plasma RIA ^{Fast Track}
Metanephrine Plasma ELISA ^{Fast Track}	Metanephrine Plasma RIA ^{Fast Track}
Normetanephrine Plasma ELISA ^{Fast Track}	Normetanephrine Plasma RIA ^{Fast Track}

Alternativ kann der Assay auf einem ELISA-Vollautomaten, wie dem Gemini von Stratec Biomedical, abgearbeitet werden. Das Gemini-Protokoll ist auf Anfrage erhältlich.

Metanephrin (Metadrenalin) und Normetanephrin (Normetadrenalin) werden mittels eines Ionenaustauscher-Gels extrahiert und danach acyliert.

Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an eine feste Phase auf der Mikrotiterplatte gebunden. Die acylierten Standards, Kontrollen und Proben und die an die Festphase gebundenen Antigene konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörper-Komplexe durch Waschen entfernt. Der an der festen Phase gebundene Antigen-Antikörper-Komplex wird mit einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen Antikörper gebunden und mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen.

Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve und Abgleich der gemessenen Absorption ermittelt.



Der Antikörper, welcher in diesem Testkit verwendet wird, erkennt lediglich die biologisch relevante L-Form der Metanephrine. Kommerziell erhältliches synthetisches Normetanephrin und Metanephrin ist aber immer eine Mischung aus der D- und L-Form. Das Verhältnis zwischen beiden Formen unterscheidet sich von Charge zu Charge. Dies hat wichtige Konsequenzen, wenn synthetische Metanephrine eingesetzt werden, um natürliche Proben anzureichern! Da nur etwa 50% dieser synthetischen D-/L-Metanephrine – nämlich nur die L-Form - mit dem Testkit detektiert werden können, werden angereicherte Proben zu niedrig gemessen. Deshalb sollten nur natürliche Proben verwendet werden.

1.2 Klinische Anwendung

Metanephrin und Normetanephrin sind Metaboliten der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Neuroendokrine Tumorzellen wie z.B. das Phäochromozytom produzieren und sekretieren episodisch Katecholamine über Vesikel in den Blutstrom. Ein kleiner Teil der Katecholamine wird zudem in den Zellen zu den jeweiligen Katecholaminmetaboliten – nämlich Metanephrin, Normetanephrin und 3-Methoxytyramin - umgewandelt, welche in kleiner Konzentration fortlaufend in den Blutstrom sezerniert werden.

Aktuelle Studien und Publikationen zeigen, dass die Quantifizierung der freien Metanephrine sowie der freien Normetanephrine in Plasma klinisch relevante biochemische Marker für die Diagnose sowie der Verlaufsbeurteilung von Phäochromozytomen sind.

Therapeutische Konsequenzen dürfen niemals allein auf Grund von Laborwerten herangezogen werden, auch wenn diese Werte in Übereinstimmung mit den Qualitätskriterien der Methode beurteilt werden. Jedes Laborergebnis trägt immer nur zu einem Teil des klinischen Bildes bei.

Nur wenn die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild stehen, dürfen daraus therapeutische Konsequenzen abgeleitet werden.

Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen**2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen**

- (1) Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter *Verwendungszweck* (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die humanes Serum oder Plasma enthaltenden Reagenzien des Kits wurden mit geprüften Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Dennoch sollten sämtliche Reagenzien bei der Handhabung und Entsorgung als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandelt werden.
- (4) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.

- (5) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pur Wasser verwenden.
- (8) Die Mikrotiterplatte verfügt über einzeln herausnehmbare und abbrechbare Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden. Die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden um Verwechslungen zu vermeiden.
- (9) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (10) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (11) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Vertiefungen sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (12) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (13) Bei jeder Testanwendung muss eine Kalibrierkurve erstellt werden.
- (14) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (15) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (16) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (17) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (18) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe Sicherheitsdatenblatt (MSDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (19) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (20) Jegliche therapeutische Maßnahme (z.B. die Verabreichung von Medikamenten vor einer planmäßigen Operation) darf sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern muss im Zusammenhang mit anderen diagnostischen Untersuchungen und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.
- (21) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

2.2 Grenzen des Tests

Jede unsachgemäße Behandlung der Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

2.2.1 Interferenzen

Proben, die ein Präzipitat oder die Fibrinfäden enthalten oder die hämolytisch oder lipämisch sind, können zu ungenauen Ergebnissen führen.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bitte den Punkt "Probenmaterial und Lagerung" beachten!

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufzubewahren. Die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 1 Monat stabil, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Beutel der Mikrotiterplatte sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

- BA D-0090** FOILS **Adhesive Foil** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel
 Volumen: 2 x 4 Folien
- BA E-0030** WASH-CONC 50x **Wash Buffer Concentrate** - Konzentrat 50x
 Inhalt: Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH
 Volumen: 2 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila
- BA E-0040** CONJUGATE **Enzyme Conjugate** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Ziege-Anti-Kaninchen Immunglobulin konjugiert mit Peroxidase
 Volumen: 2 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot
- BA E-0055** SUBSTRATE **Substrate** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Chromogenes Substrat mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid
 Volumen: 2 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz
- BA E-0080** STOP-SOLN **Stop Solution** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 0,25 M Schwefelsäure
 Volumen: 2 x 12 ml/Fläschchen, Deckel hellgrau
- BA E-0131** ADR MN **Metanephrine Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiter Streifen mit Trockenmittelbeutel in einem blauen wiederverschließbaren Beutel
- BA E-0231** NAD NMN **Normetanephrine Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiter Streifen mit Trockenmittelbeutel in einem gelben wiederverschließbaren Beutel
- BA E-8110** MN-AS **Metanephrine Antiserum** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Kaninchen Anti- Metanephrin Antikörper, blau gefärbt
 Volumen: 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau
- BA E-8210** NMN-AS **Normetanephrine Antiserum** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Kaninchen Anti- Normetanephrin Antikörper, gelb gefärbt
 Volumen: 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel gelb

Standards und **Controls** - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration pg/ml		Konzentration pmol/l		Volumen/ Fläschchen
			MN	NMN	MN	NMN	
BA E-8301	STANDARD A	weiß	0	0	0	0	4 ml
BA E-8302	STANDARD B	hellgelb	36	72	183	393	4 ml
BA E-8303	STANDARD C	orange	120	240	608	1310	4 ml
BA E-8304	STANDARD D	dunkelblau	360	720	1825	3931	4 ml
BA E-8305	STANDARD E	hellgrau	1200	2400	6084	13104	4 ml
BA E-8306	STANDARD F	schwarz	3600	7200	18252	39312	4 ml
BA E-8351	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.				4 ml
BA E-8352	CONTROL 2	dunkelrot					4 ml

Umrechnung: Metanephrin (pg/ml) x 5,07 = Metanephrin (pmol/l)
 Normetanephrin (pg/ml) x 5,46 = Normetanephrin (pmol/l)
 Inhalt: Saurer Puffer mit quecksilberfreien Stabilisatoren, aufgestockt mit definierten Mengen an Metanephrin und Normetanephrin

- BA E-8327** ADJUST-BUFF **Adjustment Buffer** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: TRIS Puffer
 Volumen: 1 x 10 ml/ Fläschchen, Deckel gelb

BA R-8313	ASSAY-BUFF	Assay Buffer - Gebrauchsfertig
Inhalt:	25% organisches Lösungsmittel	
Volumen:	1 x 30 ml/Fläschchen, Deckel orange	
BA R-8312	ACYL-CONC	Acylation Concentrate - Konzentrat
Inhalt:	Acylierungsreagenz in DMSO	
Volumen:	1 x 1,5 ml/Fläschchen, Deckel dunkelgrau	
Mögliche Gefahren:		
	H302 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.	
BA R-8318	EXTRACT-PLATE 96	Extraction Plate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well Platte, beschichtet mit Ionenaustauscher in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA R-8325	CLEAN-CONC 25x	Cleaning Concentrate - Konzentrat 25x
Inhalt:	Natriumacetat Puffer	
Volumen:	1 x 20 ml/ Fläschchen, Deckel braun	
BA R-8326	ELUTION-BUFF	Elution Buffer - Gebrauchsfertig
Inhalt:	0,1 M Natriumhydroxid, dunkellila gefärbt	
Volumen:	1 x 14 ml/ Fläschchen, Deckel dunkelgrün	
BA R-8828	EQUA-REAG	Equalizing-Reagent - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Humanes Serum, negativ auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet	
Volumen:	1 x 8 ml/Fläschchen, Deckel weiß	

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber für die Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 20 – 350 µl; 3 ml
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 – 650 nm-Filter
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Saugfähige Unterlage
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- Vortex-Mischer

5. Probenmaterial und Lagerung

Medikamente wie Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer, trizyklische Antidepressiva, MAO Inhibitoren, blutdrucksenkende Mittel und L-DOPA können die Metanephrin und Normetanephrin Konzentrationen im Plasma beeinflussen. Patienten, die diese Medikamente einnehmen, sollten vor Blutabnahme ihren behandelnden Arzt konsultieren. Sympathomimetika, Sport und Rauchen können ebenfalls den Metanephrin- und Normetanephrinwert beeinflussen. Alkohol und koffeinhaltige Getränke sollten ab einem Tag vor der Blutentnahme vermieden werden.

EDTA- oder Heparin-Plasma

Das durch Venenpunktion entnommene Vollblut in einem für EDTA- oder Heparin-Plasma vorgesehenen Blutentnahmeröhrchen (z.B. Monovette™ oder Vacuette™) sammeln und das Plasma direkt durch Zentrifugation (nach Angaben des Herstellers) von den übrigen Blutbestandteilen trennen.

Lagerung: bis zu 6 Stunden bei 2 - 8 °C; für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Hämolytische und lipämische Plasmen sollten nicht eingesetzt werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

Der ELISA kann im Über-Nacht-Verfahren ohne Schütteln (Ergebnisse innerhalb von ca. 24 Stunden) oder alternativ als schnelle Version mit verkürzter Antiserum Inkubation unter Schütteln (Ergebnisse innerhalb von 6 Stunden) durchgeführt werden.

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Extraktions- und Mikrotiterplatten müssen beschriftet werden (die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden um Verwechslungen zu vermeiden).

Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.

Die Reaktion des Antikörpers, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig und sollten durch ein Thermostat sichergestellt sein. Je höher die Temperatur, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassays ist zwischen 20 – 25 °C. Es wird empfohlen, dies mit einem Thermometer zu überprüfen.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC** **50X** mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 ° C

Cleaning Puffer

20 ml **CLEAN-CONC** **25X** mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 500 ml verdünnen.

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 ° C

Acylierungslösung

Da die gebrauchsfertige Acylierungslösung maximal 3 Minuten stabil ist, darf diese erst unmittelbar vor Gebrauch angesetzt werden. Deshalb wird die Vorbereitung im Protokoll unter Kapitel 6.3, Punkt 3 und Kapitel 6.4, Punkt 3 beschrieben.

Nach Gebrauch verwerfen!

6.2 Probenvorbereitung



Die Probenvorbereitung (Extraktion) ist für beide Assays (Metanephrin und Normetanephrin) identisch und muss deshalb nur einmal durchgeführt werden.

Extraktion

Die nachfolgende Extraktion kann mit 200 oder 250 µl Plasmaprobe durchgeführt werden.

Das Protokoll mit 250 µl Plasmaprobe ist kursiv und grau hinterlegt angegeben und kann verwendet werden, falls ein größeres Volumen beim Überstand zum Überpipettieren in den ELISA bevorzugt wird.

Das eigentliche ELISA-Protokoll wird durch die alternative Vorgehensweise bei der Extraktion nicht beeinflusst.

1.	Jeweils 20 µl Standards und Kontrollen in die entsprechenden Kavitäten der EXTRACT-PLATE 96 pipettieren. <i>Alternativ jeweils 25 µl Standards und Kontrollen in die entsprechenden Kavitäten der EXTRACT-PLATE 96 pipettieren.</i>		
2.	Jeweils 20 µl Standard A zu den für die Plasmaproben vorgesehenen Kavitäten hinzugeben. <i>Alternativ jeweils 25 µl Standard A zu den für die Plasmaproben vorgesehenen Kavitäten hinzugeben.</i>		
3.	Jeweils 200 µl EQUA-REAG zu den Standards und Kontrollen hinzugeben. <i>Alternativ jeweils 250 µl EQUA-REAG zu den Standards und Kontrollen hinzugeben.</i>		
4.	Jeweils 200 µl Plasmaproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. <i>Alternativ jeweils 250 µl Plasmaproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.</i>		
5.	Platte für 2 Stunden bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.		
6.	Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.		
7.	250 µl ASSAY-BUFF in alle Kavitäten pipettieren. 5 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.		
8.	Die Platte 3 mal gründlich mit 350 µl Cleaning Puffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.		
9.	100 µl ELUTION-BUFF in alle Kavitäten pipettieren. <i>Alternativ 125 µl ELUTION-BUFF in alle Kavitäten pipettieren.</i> <i>Bitte beachten: die Farbveränderung durch Hinzupipettieren des Elution Buffer kann zwischen Standards und Proben variieren.</i>		
10.	Platte mit FOLI abdecken und für 15 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) schütteln. FOLI entfernen. Überstand anschließend nicht verwerfen bzw. Platte nicht ausleeren! Von den Überständen werden für den nachfolgenden ELISA folgende Volumina benötigt:		
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">Metanephrin 50 µl</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">Normetanephrin 25 µl</td> </tr> </tbody> </table>	Metanephrin 50 µl	Normetanephrin 25 µl
Metanephrin 50 µl	Normetanephrin 25 µl		

6.3 Metanephrin ELISA

1.	25 µl ADJUST-BUFF in alle Kavitäten der U ADR MN pipettieren.
2.	Jeweils 50 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. <i>Um diesen Pipettierschritt zu erleichtern, halten Sie die Extraktionsplatte bitte leicht angewinkelt.</i>
3.	Vorbereitung der Acylierungslösung : Zu 3 ml Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) 80 µl ACYL-CONC (BA R-8312) pipettieren und sorgfältig mischen.
4.	25 µl frisch hergestellte Acylierungslösung in alle Kavitäten pipettieren.
5.	15 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler inkubieren (ca. 600 rpm).
6.	50 µl MN-AS in alle Kavitäten pipettieren.
7.	Die Platte mit FOIL abdecken. Zum Durchmischen die Mikrotiterplatte 1 Min. bei RT (20 – 25 °C) auf einen Schüttler stellen. Für 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren (ohne Schütteln). Alternativ 2 Stunden bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
8.	FOIL entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 4 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
9.	100 µl CONJUGATE in alle Kavitäten pipettieren.
10.	Für 30 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
11.	Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 4 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
12.	100 µl SUBSTRATE in alle Kavitäten pipettieren und für 20 - 30 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden!
13.	100 µl STOP-SOLN in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
14.	Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620-650 nm) innerhalb von 10 Minuten messen .

6.4 Normetanephrin ELISA

1.	25 µl ADJUST-BUFF in alle Kavitäten der U NAD NMN pipettieren.
2.	Jeweils 25 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. <i>Um diesen Pipettierschritt zu erleichtern, halten Sie die Extraktionsplatte bitte leicht angewinkelt.</i>
3.	Vorbereitung der Acylierungslösung : Zu 3 ml Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) 80 µl ACYL-CONC (BA R-8312) pipettieren und sorgfältig mischen.
4.	25 µl frisch hergestellte Acylierungslösung in alle Kavitäten pipettieren.
5.	15 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler inkubieren (ca. 600 rpm).
6.	50 µl NMN-AS in alle Kavitäten pipettieren.
7.	Die Platte mit FOIL abdecken. Zum Durchmischen die Mikrotiterplatte 1 Min. bei RT (20 – 25 °C) auf einen Schüttler stellen. Für 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren (ohne Schütteln). Alternativ 2 Stunden bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
8.	FOIL entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 4 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
9.	100 µl CONJUGATE in alle Kavitäten pipettieren.
10.	Für 30 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
11.	Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 4 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
12.	100 µl SUBSTRATE in alle Kavitäten pipettieren und für 20-30 Minuten bei RT (20-25°C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden!
13.	100 µl STOP-SOLN in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
14.	Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620-650 nm) innerhalb von 10 Minuten messen .

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich (Über-Nacht ELISA)	Metanephrin 15,1 – 3600 pg/ml	Normetanephrin 22,8 – 7200 pg/ml
---	---	--

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntes Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Absorption (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) erstellt.

Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) verwendet.



Dieser Assay ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die OD-Werte mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. OD Signale, die unterhalb der Standardkurve liegen, entsprechen einer sehr hohen Konzentration des Analyten in der gemessenen Probe und müssen als positiv gewertet werden.

Die Konzentrationen der **Kontrollen** und **Proben** können direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards F gefunden werden, müssen entsprechend mit dem Equalizing Reagent verdünnt und nochmals bestimmt werden.

Umrechnung

Metanephrin (pg/ml) x 5,07 = Metanephrin (pmol/l)

Normetanephrin (pg/ml) x 5,46 = Normetanephrin (pmol/l)

Erwartete Referenzwerte

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

Die unten aufgeführten erwarteten Referenzwerte basieren auf Methodenvergleichstudien zu LC-MS/MS⁽¹⁾ mit Blutproben, die in sitzender Position abgenommen wurden.

Metanephrine < 65 pg/ml	Normetanephrine < 196 pg/ml
-----------------------------------	---------------------------------------

Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist ein methodenunabhängiger Graubereich bei Metanephrin und Normetanephrin zu beachten. Dieser entspricht einer leichten bis moderaten Erhöhung bis zum 4-fachen des oberen Grenzwertes (Eisenhofer et al. 2003). In diesem Graubereich liegen ca. 20 % der Tumore, vor allem beim hereditären Syndrom oder einem Inzidentalom des Nebennierenmarks sowie vereinzelt sporadische Phäochromozytome mit einem Durchmesser von meist unter 1 cm. Bei einem Befund im Graubereich wird die wiederholte Probenname mit vorheriger Abklärung sonstiger Einflüsse wie z.B. Medikation und Alter der/des Patientin/-en empfohlen. Vergleiche hierzu auch Thomas: „Labor und Diagnose“, 8. Auflage 2012.

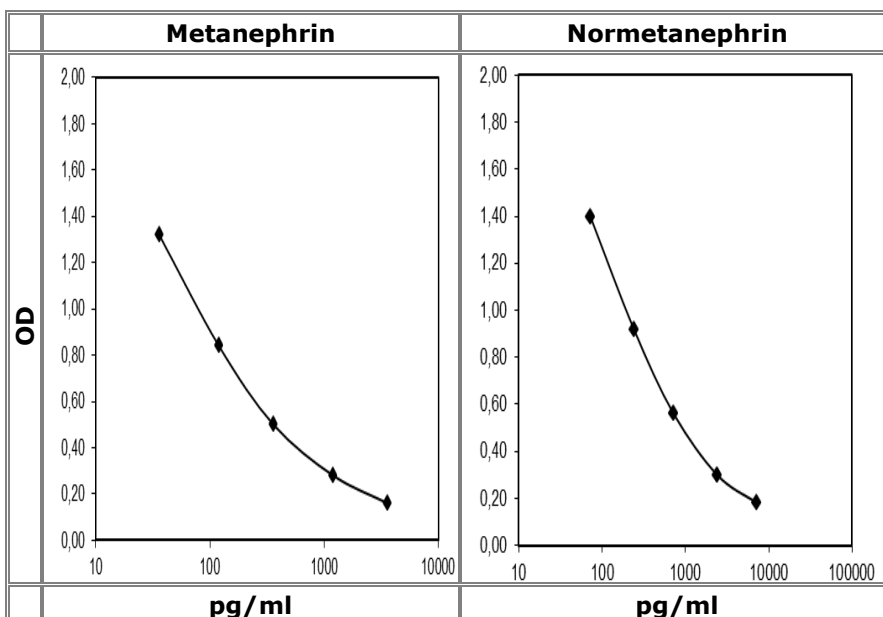
7.1 Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie entweder die Kitkontrollen und/oder andere kommerzielle Kontrollproben im normalen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Diese Kontrollen müssen dabei wie die unbekanntes Proben behandelt werden. Die Kontrollproben müssen innerhalb der Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

7.2 Typische Standardkurven



Beispiele, bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8. Testcharakteristika (Über-Nacht ELISA)

Analytische Sensitivität		Metanephrin	Normetanephrin
	LOD (pg/ml)	14,9	17,9
	LOQ (pg/ml)	15,1	22,8

Spezifität (Cross Reactivity)	Substanz	Kreuzreaktion (%)	
		Metanephrin	Normetanephrin
	Derivatisiertes Metanephrin	100	0,72
Derivatisiertes Normetanephrin	0,05	100	
3-Methoxytyramin	< 0,01	6,5*	
Adrenalin	< 0,01	< 0,01	
Noradrenalin	< 0,01	< 0,01	
Dopamin	< 0,01	< 0,01	
Vanillinmandelsäure	< 0,01	< 0,01	
Homovanillinsäure	< 0,01	< 0,01	
L-DOPA	< 0,01	< 0,01	
L-Tyrosin	< 0,01	< 0,01	
Tyramine	< 0,01	< 0,01	
Normetanephrin	< 0,01	< 0,01	
Acetaminophen	< 0,01	< 0,01	

* Normetanephrinwerte werden durch physiologische 3-Methoxytyraminwerte nicht beeinflusst. Nur stark erhöhte 3-Methoxytyraminkonzentrationen, die bei sehr seltenen ausschließlich Dopamin sezernierenden Tumoren vorkommen, können falsch positive Ergebnisse für Normetanephrin verursachen.

Präzision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Probe	Mittelwert (pg/ml)	CV (%)		Probe	Mittelwert (pg/ml)	CV (%)
Metanephrin	1	66,3	11,4	Metanephrin	1	67,8	17,6
	2	122	13,5		2	134	12,7
	3	308	10,6		3	319	11,0
	4	783	9,2		4	847	7,5
Normetanephrin	1	149	9,5	Normetanephrin	1	156	10,6
	2	282	9,1		2	287	5,0
	3	734	8,2		3	769	5,1
	4	1956	10,5		4	1949	5,9

Linearität		Serielle Verd. bis	Mittelwert (%)	Bereich (%)
	Metanephrin	1:64	107	101 - 124
	Normetanephrin	1:64	98	92 - 102


Wiederfindung		Mittelwert (%)	Bereich (%)
	Metanephrin	88	80 - 99
	Normetanephrin	109	105 - 114

Methodenvergleich: ELISA vs. LC-MS/MS ⁽¹⁾	Metanephrin	$y=0,91x + 1,8; r^2 = 0,96; n = 46$
	Normetanephrin	$y=0,93x + 13; r^2 = 0,99; n = 48$







9. Referenzen/Literatur

- (1) De Jong et al. Plasma free metanephrine measurement using automated online solid phase extraction HPLC-Tandem mass spectrometry. Clin Chem, 53(9): 1684-1693 (2007)
- (2) Eisenhofer et al. Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. Clin Chem, 60:1486-1499 (2014)
- (3) Eisenhofer et al. Plasma metadrenalines: Do they provide useful information about sympatho-adrenal function and catecholamine metabolism? Clin Sci (Lond), 88:533-542 (1995)
- (4) Berkel et al. Diagnosis of endocrine disease: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma. Eur J Endocrinol, 170: R109-R119

- (5) Manz et al. Development of enantioselective immunoassays for free plasma metanephrines. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1018:582-587 (2004)
- (6) De Jong et al. Dietary Influences on Plasma and Urinary Metanephrines: Implications for Diagnosis of Catecholamine-Producing Tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(8):2841-2849 (2009)
- (7) Deutschbein et al. Influences of Various Confounding Variable and Storage Conditions on Metanephrine and Normetanephrine Levels in Plasma. *Clin Endocrinol*, 72(2):153-160 (2010)
- (8) Eisenhofer et al. Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma: How to Distinguish True- from False-Positive Test Results. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(6):2656-2666 (2003)

 **Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anforderung von Ihrem Anbieter gerne zu Verfügung gestellt.**

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer	RUO	Nur für Forschungszwecke