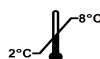


---

**Instructions for use**  
**Metanephrine Plasma ELISA**

**REF**

**BA E-8100**



**IVD**

**CE**

## 1. Introduction

### 1.1 Intended use and principle of the test

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

#### **Related Products:**

2-MET Plasma ELISA <sup>Fast Track</sup>	2-MET Plasma RIA <sup>Fast Track</sup>
	Metanephrine Plasma RIA <sup>Fast Track</sup>
Normetanephrine Plasma ELISA <sup>Fast Track</sup>	Normetanephrine Plasma RIA <sup>Fast Track</sup>

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) is 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 and the solid phase bound analytes compete 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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 Safety Data Sheet (SDS). The 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

<b>BA D-0090</b>	<b>FOILS</b>	<b>Adhesive Foil</b> - Ready to use
Content:	Adhesive Foils in a resealable pouch	
Volume:	1 x 4 foils	
<b>BA E-0030</b>	<b>WASH-CONC 50x</b>	<b>Wash Buffer Concentrate</b> - Concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 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: 1 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: 1 x 12 ml/vial, black cap

**BA E-0080** **STOP-SOLN** **Stop Solution** - Ready to use  
 Content: 0.25 M sulfuric acid  
 Volume: 1 x 12 ml/vial, light grey cap

Hazards identification:



H290 May be corrosive to metals.  
 H314 Causes severe skin burns and eye damage.

**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-8110** **MN-AS** **Metanephrine Antiserum** - Ready to use  
 Content: Rabbit anti- Metanephrine antibody, blue coloured  
 Volume: 1 x 6 ml/vial, blue cap

**Standards and Controls** - Ready to use

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

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

Content: Acidic buffer with non-mercury stabilizer, spiked with a defined quantity of Metanephrine

**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.

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

##### 6.1 Preparation of reagents

###### Wash Buffer

Dilute the 20 ml of Wash Buffer Concentrate with water (deionized, distilled, or ultra-pure) to a final volume of 1000 ml.

Storage: 1 month at 2 - 8 °C

###### Cleaning Buffer

Dilute the 20 ml Cleaning Concentrate with water (deionized, distilled, or ultra-pure) to a final volume of 500 ml.

Storage: 1 month at 2 - 8 °C

### Acylation Solution


As the Acylation Solution is only **stable for a maximum of 3 minutes**, it should not be prepared before starting the assay. Therefore its preparation is described in the protocol in chapter 6.3, step 3.

Discard after use!

### Metanephrine Microtiter Strips

In rare cases residues of the blocking and stabilizing reagent can be seen in the wells as small, white dots or lines. These residues do not influence the quality of the product.

## 6.2 Preparation of samples Extraction

1.	Pipette <b>20 µl</b> of <b>standards</b> and <b>controls</b> into the respective wells of the <b>Extraction Plate</b> .
2.	Add <b>20 µl Standard A</b> to all wells containing <b>plasma samples</b> .
3.	Add <b>200 µl of Equalizing Reagent</b> to the wells with <b>standards and controls</b> .
4.	Pipette <b>200 µl</b> of <b>plasma samples</b> to the respective wells.
5.	Incubate plate <b>for 2 hours</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
6.	Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
7.	Pipette <b>250 µl</b> of <b>Assay Buffer</b> into all wells. Incubate the plate for <b>5 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Wash the plate <b>3 x</b> by adding <b>350 µl</b> of <b>Cleaning Buffer</b> , <b>discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.
9.	Pipette <b>100 µl</b> of <b>Elution Buffer</b> into all wells. <i>Please note: the colour changes caused by the elution buffer can vary between standards and samples.</i>
10.	Cover plate with adhesive foil. Incubate <b>15 min</b> at <b>RT</b> (20 - 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). Remove the foil.
	<b>Do not decant the supernatant thereafter!</b> The following volumes of the supernatant are needed for the subsequent ELISA: <b>Metanephrine 50 µl</b>

## 6.3 Metanephrine ELISA

1.	Pipette <b>25 µl</b> of <b>Adjustment Buffer</b> into all wells of the <b>Metanephrine Microtiter Strips</b> .
2.	Pipette <b>50 µl</b> of the extracted <b>standards, controls and samples</b> into the respective wells.
3.	Preparation of <b>Acylation Solution</b> : Pipette <b>80 µl Acylation Reagent Concentrate</b> (BA R-8312) to <b>3 ml water</b> (deionized, distilled, or ultra-pure) and mix thoroughly.
4.	Pipette <b>25 µl</b> of the freshly prepared <b>Acylation Solution</b> into all wells.
5.	Incubate for <b>15 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
6.	Pipette <b>50 µl</b> of the <b>Metanephrine Antiserum</b> into all wells.
7.	Cover the plate with <b>Adhesive Foil</b> , shake for <b>1 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> and incubate for <b>15 - 20 h</b> (overnight) at <b>2 – 8 °C</b> 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 <b>4 x</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash Buffer</b> , <b>discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.
9.	Pipette <b>100 µl</b> of the <b>Enzyme Conjugate</b> into all wells.
10.	Incubate for <b>30 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
11.	Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate <b>4 x</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash Buffer</b> , <b>discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.
12.	Pipette <b>100 µl</b> of the <b>Substrate</b> into all wells and incubate for <b>20 - 30 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). <b>Avoid exposure to direct sunlight!</b>
13.	Add <b>100 µl</b> of the <b>Stop Solution</b> to all wells and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
14.	<b>Read</b> the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to <b>450 nm</b> (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

**7. Calculation of results**

<b>Measuring range (overnight ELISA)</b>	<b>Metanephrine</b>
	15.1 – 3 600 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)

**Expected reference value**

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference value. The expected reference values indicated below are based on method comparison studies to LC-MS/MS <sup>(1)</sup> with blood samples taken in the sitting position.

<b>Metanephrine</b>
< 65 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 mediate 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.

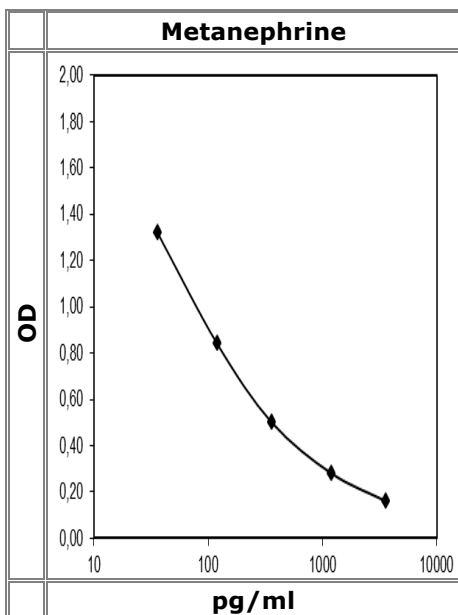
In case of a result in the grey area, it is recommended to collect a new sample together with an anamnesis concerning especially influences like the medication and age of the patient.

**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 curve**

**▲** *Example, do not use for calculation!*



## 8. Assay characteristics (overnight ELISA)

<b>Analytical Sensitivity</b>		<b>Metanephrine</b>
	LOD (pg/ml)	14.9
	LOQ (pg/ml)	15.1

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

<b>Precision</b>							
<b>Intra-Assay</b>				<b>Inter-Assay</b>			
	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

<b>Linearity</b>		Serial dilution up to	Mean (%)	Range (%)
	Metanephrine	1:64	107	101 - 124

<b>Recovery</b>		Mean (%)	Range (%)
	Metanephrine	88	80 - 99

<b>Method Comparison: ELISA vs. LC-MS/MS<sup>(1)</sup></b>	Metanephrine	$y=0.91x + 1.8; r^2 = 0.96; n = 46$
--	--------------	-------------------------------------







## 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 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)



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

**Symbols:**

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

**1. Einleitung**

**1.1 Verwendungszweck und Testprinzip**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von freiem Metanephrin in Plasma.

**Artverwandte Produkte:**

2-MET Plasma ELISA <sup>Fast Track</sup>	2-MET Plasma RIA <sup>Fast Track</sup>
	Metanephrine Plasma RIA <sup>Fast Track</sup>
Normetanephrine Plasma ELISA <sup>Fast Track</sup>	Normetanephrine Plasma RIA <sup>Fast Track</sup>

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) wird 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 bestimmt 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.

**Die Antikörper, welche in diesem Testkit verwendet werden, erkennen 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 synthetischer 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**

Metanephrine und Normetanephrine 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 biochemischen 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 (SDS). 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: 1 x 4 Folien

**BA E-0030** WASH-CONC 50x **Wash Buffer Concentrate** - Konzentrat 50x

Inhalt: Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und einem physiologischem pH

Volumen: 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila

**BA E-0040** CONJUGATE **Enzyme Conjugate** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Ziege-Anti-Kaninchen Immunglobulin konjugiert mit Peroxidase

Volumen: 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot

**BA E-0055** SUBSTRATE **Substrate** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Chromogenes Substrate mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid

Volumen: 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz

**BA E-0080** STOP-SOLN **Stop Solution** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 0,25 M Schwefelsäure

Volumen: 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel hellgrau

Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.  
H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

**BA E-0131** M 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-8110** MN-AS **Metanephrine Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Anti- Metanephrin Kaninchen Antikörper, blau gefärbt

Volumen: 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau

**Standards und Controls** - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration	Konzentration	Volumen/ Fläschchen
			pg/ml	pmol/l	
			<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MN</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MN</span>	
<b>BA E-8301</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">A</span>	weiß	0	0	4 ml
<b>BA E-8302</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">B</span>	hellgelb	36	183	4 ml
<b>BA E-8303</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span>	orange	120	608	4 ml
<b>BA E-8304</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">D</span>	dunkelblau	360	1825	4 ml
<b>BA E-8305</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">E</span>	hellgrau	1200	6084	4 ml
<b>BA E-8306</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span>	schwarz	3600	18252	4 ml
<b>BA E-8351</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">1</span>	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.		4 ml
<b>BA E-8352</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">2</span>	dunkelrot			4 ml


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

Inhalt: Saurer Puffer mit quecksilberfreien Stabilisatoren, aufgestockt mit definierten Mengen an Metanephrin

**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 14 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. Extraktion- 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 beschrieben.

Nach Gebrauch verwerfen!

### Metanephrin Microtiter Strips

Vereinzelt können Rückstände der Blockier- und Stabilisierlösung in den Wells zu sehen sein (kleine weiße Punkte oder Linien). Diese stellen keine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes dar.

## 6.2 Probenvorbereitung

### Extraktion

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

### 6.3 Metanephrin ELISA

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

### 7. Berechnung der Ergebnisse

<b>Messbereich (Über-Nacht ELISA)</b>	<b>Metanephrin</b> 15,1 – 3600 pg/ml
---	---

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntenen Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Absorptionen (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)

#### Erwarteter Referenzwert

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzwert ermittelt.

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

<b>Metanephrin</b> < 65 pg/ml
----------------------------------

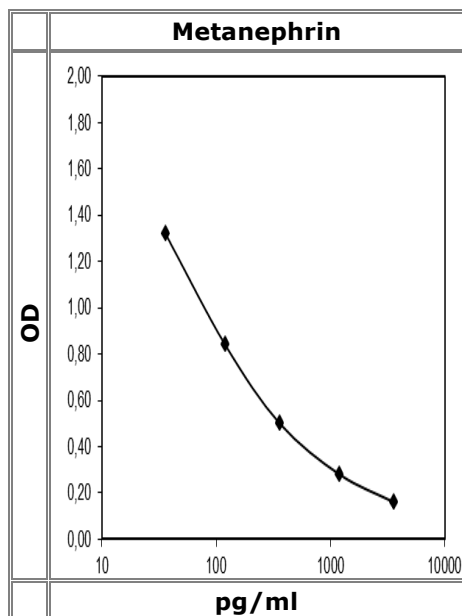
Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist ein methodenunabhängiger Graubereich bei Metanephrin und Normetanephrin zu beachten. Dieser entspricht einer leichten bis moderaten Erhöhung bis zum 4-fachen des oberen Grenzwertes (Eisenhofer et al. 2003). In diesem Graubereich liegen ca. 20 % der Tumore, vor allem 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 unbekanntenen Proben behandelt werden. Die Kontrollproben müssen innerhalb der Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

### 7.2 Typische Standardkurve

**▲** **■** *Beispiel, bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



### 8. Testcharakteristika (Über-Nacht ELISA)

Analytische Sensitivität	Metanephrin	
	LOD (pg/ml)	14,9
	LOQ (pg/ml)	15,1

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

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



<b>Linearität</b>		Serielle Verd. bis	Mittelwert (%)	Bereich (%)
	Metanephrin	1:64	107	101 - 124

<b>Wiederfindung</b>		Mittelwert (%)	Bereich (%)
	Metanephrin	88	80 - 99







<b>Methodenvergleich: ELISA vs. LC-MS/MS<sup>(1)</sup></b>	Metanephrin	$y=0,91x + 1,8; r^2 = 0,96; n = 46$
--	-------------	-------------------------------------

## 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	<b>LOT</b>	Chargennummer	<b>IVD</b>	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	<b>CONT</b>	Inhalt	<b>CE</b>	CE gekennzeichnet
	Achtung	<b>REF</b>	Katalog-Nummer	<b>RUO</b>	Nur für Forschungszwecke