



ImmuSmol SAS  
229 Cours de l'Argonne / 33000 Bordeaux / France



LDN Labor Diagnostika Nord GmbH & Co.KG  
Am Eichenhain 1 / 48531 Nordhorn / Germany

---

**Instructions for use**  
**Metanephrine Urine ELISA**

**REF**

**BA E-8400**



**IVD**



**1. Introduction****1.1 Intended use and principle of the test**

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Metanephrine in urine.

During the sample preparation Metanephrine (Metadrenaline) is quantitatively acylated.

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 analyte 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 standard concentrations.

*⚠ The anti-Metanephrine antibodies used in this test kit only recognise the biologically relevant L-forms of Metanephrine. Commercially available synthetic Metanephrine is always a mixture of the D- and L-forms. The ratio between both forms differs widely from lot to lot. This has important implications if synthetic Metanephrine is used to enrich native samples. As only about 50% of the synthetic Metanephrine – 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. They are metabolized to Vanillylmandelic acid or excreted with the urine.

Patients with pheochromocytoma or other tumors derived from neuroendocrine cells show elevated urinary levels of total Metanephrines.

As catecholamine secretion from neuroendocrine cells might show high variations, urine samples collected over a period of 24 hours are used to average these fluctuations.

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) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) 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.
- (6) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (7) 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.
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (9) 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.
- (10) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (11) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (12) A standard curve must be established for each run.
- (13) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report.

- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (19) 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.
- (20) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed according to national regulations.
- (21) In case of any severe damage to the test kit or components, the manufacturer has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components must not be used for a test run. They must be stored properly until the manufacturer decides what to do with them. If it is decided that they are no longer suitable for measurements, they must be disposed of in accordance with national regulations.

## 2.2 Limitations

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

### 2.2.1 Interfering substances

#### 24-hour urine

Please note the sample preparation! If the percentage of the final concentration of acid is too high, this will lead to incorrect results for the urine samples.

### 2.2.2 Drug interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of Metanephrine level in the sample.

### 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 2 months 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-0023</b>	<b>REAC-TUBES</b>	<b>Reaction Tubes</b> – Ready to use
Content:	Reaction Tubes in a resealable pouch	
Volume:	2 x 50 tubes	
<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	
<b>BA E-0045</b>	<b>CONJUGATE</b>	<b>Enzyme Conjugate</b> – Ready to use
Content:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
<b>BA E-0055</b>	<b>SUBSTRATE</b>	<b>Substrate</b> – 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.

**BA E-0131** ADR MN **Metanephrine Microtiter Strips** – Ready to use

Content: 1 x 96 wells (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable blue pouch with desiccant

**BA E-8410** MN-AS **Metanephrine Antiserum** – Ready to use

Content: Rabbit anti-Metanephrine antibody, blue coloured  
 Volume: 1 x 12 ml/vial, blue cap


**Standards and Controls** – Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration	Concentration	Volume/ Vial
			ng/ml (= µg/l)	nmol/l	
			MN	MN	
<b>BA R-8601</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">A</span>	white	0	0	4 ml
<b>BA R-8602</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">B</span>	light yellow	20	101	4 ml
<b>BA R-8603</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span>	orange	60	304	4 ml
<b>BA R-8604</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">D</span>	dark blue	200	1 014	4 ml
<b>BA R-8605</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">E</span>	light grey	600	3 042	4 ml
<b>BA R-8606</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span>	black	2 000	10 140	4 ml
<b>BA R-8651</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">1</span>	light green	Refer to QC-Report for expected value		4 ml
<b>BA R-8652</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">2</span>	dark red	and acceptable range!		4 ml

Conversion: Metanephrine (ng/ml) x 5.07 = Metanephrine (nmol/l)

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

**BA R-0012** ACYL-CONC **Acylation Concentrate** – Concentrated

Content: Concentrated acylation reagent  
 Volume: 1 x 0.5 ml/vial, pink cap  
 Hazards identification: 

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

**BA R-0075** ACYL-DILUENT **Acylation Diluent** – Ready to use

Content: Dimethylsulfoxide  
 Volume: 1 x 4 ml/vial, dark grey cap

**BA R-8611** ACYL-BUFF **Acylation Buffer** – Ready to use

Content: TRIS buffer  
 Volume: 1 x 30 ml/vial, white cap

**BA R-8619** HCL **Hydrochloric Acid** – Ready to use

Content: 0.25 M hydrochloric acid, yellow coloured  
 Volume: 1 x 30 ml/vial, dark green cap

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

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10–600 µl; 1.2–3 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
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Vortex mixer
- Temperature controlled water bath (90 °C) or similar heating device

⚠ The assay can be performed with or without shaking. If a microtiter plate shaker is used, it should have the following characteristics: shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm

#### 5. Sample collection and storage

Spontaneous or 24-hour urine, collected in a bottle containing 10–15 ml of 6 M HCl, should be used. Determine the total volume of urine excreted during a period of 24 h for calculation of the results. Storage: up to 5 days at 2–8 °C, for longer periods (up to 6 months) at -20 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided. Avoid exposure to direct sunlight.

#### 6. Test procedure

Allow all reagents to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the Reaction Tubes accordingly. Duplicate determinations are recommended. It is recommended to number the strips of the microwell plate before usage to avoid any mix-up.

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. Varying incubation times will have similar influences on the absorbance. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20–25 °C.

##### 6.1 Preparation of reagents

###### **Wash Buffer**

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

Storage: 1 month at 2–8 °C

###### **Acylation Solution**

⚠ Before preparing the Acylation Solution make sure that the Acylation Diluent (BA R-0075) has reached room temperature ( $\geq 20$  °C) and forms a homogenous, crystal-free solution.

Dilute the Acylation Concentrate (BA R-0012) 1 + 60 with Acylation-Diluent in a glass or polypropylene-vial.

<b>Acylation Concentrate</b>	10 µl	20 µl	25 µl	50 µl
<b>Acylation-Diluent</b>	600 µl	1.2 ml	1.5 ml	3 ml

⚠ The Acylation Solution has to be prepared freshly prior to the assay (not longer than 60 minutes in advance). 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 lines or dots. These residues do not influence the quality of the product.

##### 6.2 Sample preparation and acylation

###### **Hydrolysis**


<b>1.</b>	Pipette <b>25 µl</b> of <b>standards, controls, and urine samples</b> into the respective <b>Reaction Tubes</b> .
<b>2.</b>	Add <b>250 µl Hydrochloric Acid</b> to all tubes.
<b>3.</b>	Mix thoroughly (vortex) and hydrolyze for <b>30 min</b> at <b>90 °C</b> .
<b>4.</b>	Cool down the tubes to room temperature.

## Acylation

1.	Pipette <b>250 µl</b> of <b>Acylation Buffer</b> into all tubes.
2.	Add <b>25 µl</b> of <b>Acylation Solution</b> ( <i>refer to 6.1</i> ) to all tubes.
3.	Mix thoroughly (vortex) and acylate for <b>15 min</b> at <b>RT</b> (20–25 °C).
4.	Add <b>2.5 ml water</b> (deionized, distilled, or ultra-pure) to all tubes.
	Take <b>25 µl</b> of the acylated <b>standards, controls and urine samples</b> for the <b>Metanephrine ELISA</b> .

### 6.3 Metanephrine ELISA


The usage of a shaker is not mandatory. The alternative protocol without shaker is highlighted in italic and shaded in grey.

1.	Pipette <b>25 µl</b> of the <b>acylated standards, controls and samples</b> into the appropriate wells of the <b>Metanephrine Microtiter Strips</b> .
2.	Pipette <b>100 µl</b> of the <b>Metanephrine Antiserum</b> into all wells.
3.	Incubate <b>30 min</b> at <b>RT</b> (20–25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). <i>Without usage of a shaker: shake <b>Metanephrine Microtiter Strips</b> shortly by hand and incubate for <b>1 h</b> at <b>RT</b> (20–25 °C).</i>
4.	Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate <b>3 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.
5.	Pipette <b>100 µl</b> of the <b>Enzyme Conjugate</b> into all wells.
6.	Incubate for <b>15 min</b> at <b>RT</b> (20–25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). <i>Without usage of a shaker: incubate for <b>15 min</b> at <b>RT</b> (20–25 °C).</i>
7.	Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate <b>3 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.
8.	Pipette <b>100 µl</b> of the <b>Substrate</b> into all wells.
9.	Incubate for <b>15 ± 2 min</b> at <b>RT</b> (20–25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). <i>Without usage of a shaker: incubate for <b>15 min ± 2</b> at <b>RT</b> (20–25 °C).</i>
	<b>Avoid exposure to direct sunlight!</b>
10.	Add <b>100 µl</b> of the <b>Stop Solution</b> to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
11.	<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</b>	<b>Metanephrine</b>
	10.5–2 000 ng/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. 4-parameter, marquardt).

 *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.

The amount of analyte excreted per day (µg/day) is calculated according to:

$$\text{concentration of the sample (in } \mu\text{g/l)} \times \text{volume of urine excreted per day (in l/day)}$$

#### Example

The concentration of the sample read from the curve is 125 µg/l. The amount of urine collected during 24 hours is 1.3 l. Then the amount of analyte excreted during one day would be:

$$125 \mu\text{g/l} \times 1.3 \text{ l/day} = 162.5 \mu\text{g/day}$$

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

### Conversion

Metanephrine (ng/ml) x 5.07 = Metanephrine (nmol/l)

### Expected reference value

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

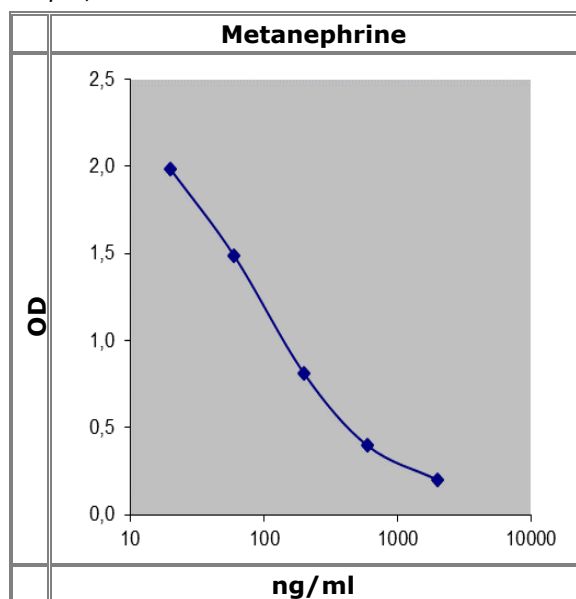
	<b>Metanephrine</b>
24-hour urine	< 350 µg/day

### 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 on the QC-Report.

### 7.2 Typical standard curve

⚠ Example, do not use for calculation!



### 8. Assay characteristics

<b>Analytical Sensitivity</b>		<b>Metanephrine</b>
	LOD	8.6 ng/ml
	LOB	6.0 ng/ml
	LOQ	10.5 ng/ml

<b>Analytical Specificity (Cross Reactivity)</b>	<b>Substance</b>	<b>Cross Reactivity (%)</b>
		Metanephrine
	Derivatized Metanephrine	100
	Derivatized Normetanephrine	0.15
	Derivatized 3-methoxytyramine	< 0.01
	Adrenaline	3.3
	Noradrenaline	< 0.01
	Dopamine	< 0.01
	Vanillic mandelic acid, L-Dopa, Homovanillic acid, L-Tyrosin, Tyramin	< 0.01

<b>Precision</b>							
<b>Intra-Assay</b>				<b>Inter-Assay</b>			
	Sample	Range (ng/ml)	CV (%)		Sample	Range (ng/ml)	CV (%)
Metanephrine	1	34.4 ± 3.1	9	Metanephrine	1	32.8 ± 5.4	16
	2	59.8 ± 5.1	9		2	57.2 ± 9.0	16
	3	141 ± 13.8	10		3	144 ± 25.0	17
	4	575 ± 71.4	12		4	394 ± 64.1	16

<b>Linearity</b>		Serial dilution up to	Mean (%)	Range (%)
	Metanephrine	1:64	102	94-115

<b>Recovery</b>		Mean (%)	Range (%)	Range (ng/ml)
	Metanephrine	97	85-113	20.2-1484







<b>Method Comparison versus HPLC*</b>	Metanephrine	HPLC = 0.9 ELISA - 0.8	r = 0.99; n = 40
*The concentrations were assessed using both the ELISA and the HPLC method (external QC samples from UK NEQAS). The correlation between ELISA and HPLC is excellent. Please take in mind, that the UK control values are the mean of about 40 different HPLC users, and contain always one pathological sample per sending.			

## 9. References/Literature

- (1) Parrott et al. Urinary corticosterone and normetanephrine levels after voluntary wheel and forced treadmill running in the db/db mouse. *Journal of Diabetes Mellitus*, 1(4):71-78 (2011)
- (2) Petramala et al. Multiple Catecholamine-Secreting Paragangliomas: Diagnosis after Hemorrhagic Stroke in a Young Woman. *Endocrine Practice*, 14(3):340-346 (2008)
- (3) Sato et al. Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nature Medicine*, 13:1234-1240 (2007)

 **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		



## 1. Einleitung

### 1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Metanephrin in Urin.

Während der Probenvorbereitung wird Metanephrin zu seinem entsprechenden N-Acyl-Derivat umgewandelt. Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an eine feste Phase 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.

⚠ *Der anti-Metanephrin Antikörper, welcher in diesem Testkit verwendet wird, erkennt lediglich die biologisch relevante L-Form des Metanephrins. Kommerziell erhältliches synthetisches Metanephrin ist jedoch 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 synthetisches Metanephrin eingesetzt wird, um natürliche Proben anzureichern. Da nur etwa 50% dieses synthetischen D-/L-Metanephrins – nämlich nur die L-Form – mit dem Testkit detektiert werden kann, 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 und werden zum Teil im Körper zu Vanillinmandelsäure metabolisiert oder direkt über den Urin ausgeschieden. Patienten mit einem Phäochromozytom oder anderen neuroendokrinen Tumoren weisen eine erhöhte Konzentration der Metanephrine bzw. Normetanephrine im Urin auf. Da die Katecholamine Sekretion aus den neuroendokrinen Zellen phasenweise stark schwankt, soll 24-Stunden Urin verwendet werden.

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 Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (4) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) 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.
- (6) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.
- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über abbrechbare Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
- (8) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (9) 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.

- (10) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Vertiefungen sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (11) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (12) Bei jeder Testanwendung muss eine Kalibrierkurve erstellt werden.
- (13) 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.
- (14) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe das Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (18) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (19) 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.
- (20) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
- (21) Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen sachgerecht gelagert werden, bis der Hersteller entscheidet, wie mit ihnen zu verfahren ist. Sollte entschieden werden, dass sie für Messungen nicht mehr geeignet sind, müssen sie entsprechend den nationalen Richtlinien entsorgt werden.

## 2.2 Grenzen des Tests

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

### 2.2.1 Interferenzen

#### Sammelurin

Probenvorbereitung beachten! Ist der Säuregehalt des 24-Stunden-Sammelurins zu hoch, führt dies zu falschen Ergebnissen der Urinproben.

### 2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des Metanephrin-Gehaltes in der Probe beeinflusst.

### 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 2 Monate 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-0023**    **REAC-TUBES**    **Reaction Tubes** – Gebrauchsfertig

Inhalt:            Reaktionsröhrchen in einem wiederverschließbaren Beutel


Volumen:        2 x 50 Röhrchen

**BA E-0030** **WASH-CONC** **50x** **Wash Buffer Concentrate** – 50x konzentriert  
 Inhalt: Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH  
 Volumen: 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila

**BA E-0045** **CONJUGATE** **Enzyme Conjugate** – Gebrauchsfertig  
 Inhalt: Ziege Anti-Kaninchen Immunglobuline konjugiert mit Peroxidase  
 Volumen: 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot

**BA E-0055** **SUBSTRATE** **Substrate** – Gebrauchsfertig  
 Inhalt: Chromogenes Substrat 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.


**BA E-0131** **ADR** **MN** **Metanephrine Microtiter Strips** – Gebrauchsfertig  
 Inhalt: 1 x 96 Wells (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem blauen wiederverschließbaren Beutel

**BA E-8410** **MN-AS** **Metanephrine Antiserum** – Gebrauchsfertig  
 Inhalt: Kaninchen Anti-Metanephrin Antikörper, blau gefärbt  
 Volumen: 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel blau

**Standards und Controls** – Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration	Konzentration	Volumen/ Fläschchen
			ng/ml (= µg/l)	nmol/l	
			MN	MN	
<b>BA R-8601</b>	<b>STANDARD</b> A	weiß	0	0	4 ml
<b>BA R-8602</b>	<b>STANDARD</b> B	hellgelb	20	101	4 ml
<b>BA R-8603</b>	<b>STANDARD</b> C	orange	60	304	4 ml
<b>BA R-8604</b>	<b>STANDARD</b> D	dunkelblau	200	1014	4 ml
<b>BA R-8605</b>	<b>STANDARD</b> E	hellgrau	600	3042	4 ml
<b>BA R-8606</b>	<b>STANDARD</b> F	schwarz	2000	10140	4 ml
<b>BA R-8651</b>	<b>CONTROL</b> 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen		4 ml
<b>BA R-8652</b>	<b>CONTROL</b> 2	dunkelrot	und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.		4 ml

Umrechnung: Metanephrin (ng/ml) x 5.07 = Metanephrin (nmol/l)  
 Inhalt: Saurer Puffer mit quecksilberfreien Konservierungsmitteln, aufgestockt mit einer definierten Menge Metanephrin

**BA R-0012** **ACYL-CONC** **Acylation Concentrate** – konzentriert  
 Inhalt: Konzentriertes Azylierungsreagenz  
 Volumen: 1 x 0,5 ml/Fläschchen, Deckel hellrosa  
 Mögliche Gefahren: 

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

**BA R-0075** **ACYL-DILUENT** **Acylation Diluent** – Gebrauchsfertig  
 Inhalt: Dimethylsulfoxid  
 Volumen: 1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel dunkelgrau

**BA R-8611** **ACYL-BUFF** **Acylation Buffer** – Gebrauchsfertig

Inhalt: TRIS Puffer  
Volumen: 1 x 30 ml/Fläschchen, Deckel weiß

**BA R-8619** **HCL** **Hydrochloric Acid** – Gebrauchsfertig

Inhalt: 0,25 M Salzsäure, gelb gefärbt  
Volumen: 1 x 30 ml/Fläschchen, Deckel dunkelgrün

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

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10–600 µl; 1,2–3 ml
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620–650 nm-Filter
- Saugfähige Unterlage
- Vortex-Mischer
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- Temperaturkontrolliertes Wasserbad (90 °C) oder ähnliche Heizvorrichtung

⚠ Der Assay kann ohne Verwendung eines Mikrotiterplattenschüttlers durchgeführt werden. Wird jedoch ein Schüttler verwendet, sollte dieser folgende Charakteristika haben: Amplitude 3 mm; ca. 600 rpm.

**5. Probenmaterial und Lagerung**

Spontan- oder 24-Stunden Sammelurin (gesammelt in einem Behälter mit 10–15 ml 6 M HCl). Für die quantitative Bestimmung der im Verlauf eines Tages ausgeschiedenen Menge an Metanephrin ist es notwendig, das Volumen des Tagesurins zu bestimmen und für die spätere Auswertung der Ergebnisse zu notieren.  
Lagerung: bis zu 5 Tage bei 2–8 °C, für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C. Direktes Sonnenlicht vermeiden.  
Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden.

**6. Testdurchführung**

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Die **REAC-TUBES** entsprechend nummerieren. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen. Um eventuelle Verwechslungen der Mikrotiterstreifen zu vermeiden, wird empfohlen, diese vor Verwendung zu nummerieren.

Die Reaktion des Antikörpers, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassays liegt zwischen 20–25 °C.

**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

**Azylierungslösung**

⚠ Das **ACYL-DILUENT** (BA R-0075) muss vor Verwendung auf Raumtemperatur ( $\geq 20$  °C) gebracht werden und eine homogene, kristallfreie Lösung bilden.

Das **ACYL-CONC** (BA R-0012) wird mit dem **ACYL-DILUENT** (BA R-0075) **1 + 60** in einem **Glas- oder Polypropylenröhrchen** verdünnt.

<b>ACYL-CONC (BA R-0012)</b>	10 µl	20 µl	25 µl	50 µl
<b>ACYL-DILUENT (BA R-0075)</b>	600 µl	1,2 ml	1,5 ml	3 ml

⚠ Die Azylierungslösung erst unmittelbar vor Gebrauch ansetzen (maximal 60 Minuten vorher) und nach Gebrauch Reste verwerfen!

**Metanephrine 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 und Azylierung

### Hydrolyse

1.	Jeweils <b>25 µl</b> der <b>Standards, Kontrollen</b> und <b>Urinproben</b> in die entsprechenden <b>REAC-TUBES</b> pipettieren.
2.	<b>250 µl HCL</b> in <b>alle REAC-TUBES</b> hinzufügen.
3.	Die <b>REAC-TUBES</b> sorgfältig mischen (Vortex) und <b>30 Min</b> bei <b>90 °C</b> inkubieren.
4.	Die <b>REAC-TUBES</b> auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

### Azylierung

1.	Jeweils <b>250 µl ACYL-BUFF</b> in alle <b>REAC-TUBES</b> pipettieren.
2.	<b>25 µl Azylierungslösung</b> (siehe 6.1) in alle <b>REAC-TUBES</b> pipettieren.
3.	Sorgfältig mischen (Vortex) und für <b>15 Min</b> bei <b>RT</b> (20–25 °C) inkubieren.
4.	<b>2,5 ml Wasser</b> (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in alle <b>REAC-TUBES</b> hinzufügen.
	Jeweils <b>25 µl</b> der <b>azylierten Standards, Kontrollen und Urinproben</b> werden für den nachfolgenden <b>Metanephrine ELISA</b> benötigt.

## 6.3 Metanephrine ELISA

Die Verwendung eines Schüttlers ist nicht unbedingt erforderlich. Die alternativen Inkubationszeiten ohne Schüttler sind jeweils in kursiver Schreibweise vermerkt und grau hinterlegt.


1.	Jeweils <b>25 µl</b> der <b>azylierten Standards, Kontrollen</b> und <b>Proben</b> in die entsprechenden Kavitäten der <b>ADR MN</b> pipettieren.
2.	Jeweils <b>100 µl MN-AS</b> in alle Kavitäten pipettieren.
3.	Platte <b>30 Min</b> bei <b>RT</b> (20–25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren. <i>(oder kurz per Hand schütteln und 1 Stunde bei RT (20–25 °C) ohne Schüttler inkubieren).</i>
4.	Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten <b>3-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.
5.	Jeweils <b>100 µl CONJUGATE</b> in alle Kavitäten pipettieren.
6.	Für <b>15 Min</b> bei <b>RT</b> (20–25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren. <i>(oder 15 Minuten bei RT (20–25 °C) ohne Schüttler inkubieren).</i>
7.	Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten <b>3-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.
8.	Jeweils <b>100 µl SUBSTRATE</b> in alle Kavitäten pipettieren.
9.	Für <b>15 ± 2 Min</b> bei <b>RT</b> (20–25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren. <i>(oder 15 ± 2 Minuten bei RT (20–25 °C) ohne Schüttler inkubieren).</i> <b>Direktes Sonnenlicht vermeiden!</b>
10.	<b>100 µl STOP-SOLN</b> in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
11.	<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</b>	<b>Metanephrin</b>
	10,5–2000 ng/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.: 4-parameter, marquardt) 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 Proben können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Die Gesamtmenge an Metanephrin, die im Verlauf von 24 Stunden ausgeschieden wird, errechnet sich nach:

Aus der Standardkurve abgelesene Konzentration der Probe (in µg/l) x Tagesmenge Urin (in l/Tag)

**Beispiel**

Die abgelesene Konzentration der Probe aus der Standardkurve beträgt 125 µg/l. Die Tagesmenge an gesammeltem Urin beträgt 1,3 l. Demnach ist die Gesamtmenge, die im Verlauf von 24 Stunden ausgeschieden wurde, folgende:

$$125 \mu\text{g/l} \times 1,3 \text{ l/Tag} = 162,5 \mu\text{g/Tag}$$

Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards F gefunden werden, müssen entsprechend mit Standard A verdünnt und nochmals bestimmt werden.

**Umrechnung**

$$\text{Metanephrin (ng/ml)} \times 5,07 = \text{Metanephrin (nmol/l)}$$

**Erwarteter Referenzwert**

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

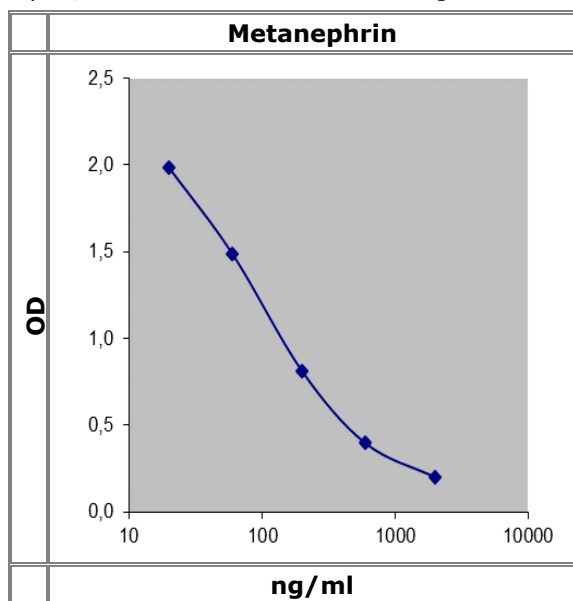
	<b>Metanephrin</b>
Sammelurin	< 350 µg/Tag

**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**

<b>Analytische Sensitivität</b>		<b>Metanephrin</b>
	LOD	8,6 ng/ml
	LOB	6,0 ng/ml
	LOQ	10,5 ng/ml

<b>Spezifität</b>	<b>Substanz</b>	<b>Kreuzreaktion (%)</b>
		Metanephrin
	Derivatisiertes Metanephrin	100
	Derivatisiertes Normetanephrin	0,15
	Derivatisiertes 3-Methoxytyramin	< 0,01
	Adrenalin	3,3
Noradrenalin	< 0,01	

<b>(Kreuzreaktion)</b>	Dopamin	< 0,01
	Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure, L-Dopa, L-Tyrosin, Tyramin	< 0,01

<b>Präzision</b>							
<b>Intra-Assay</b>				<b>Inter-Assay</b>			
	Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)		Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)
Metanephrin	1	34,4 ± 3,1	9	Metanephrin	1	32,8 ± 5,4	16
	2	59,8 ± 5,1	9		2	57,2 ± 9,0	16
	3	141 ± 13,8	10		3	144 ± 25,0	17
	4	575 ± 71,4	12		4	394 ± 64,1	16

<b>Linearität</b>		Serielle Verdünnung bis	Mittelwert (%)	Bereich (%)
	Metanephrin	1:64	102	94-115

<b>Wiederfindung</b>		Mittelwert (%)	Bereich (%)	Bereich (ng/ml)
	Metanephrin	97	85-113	20,2-1484







<b>Methodenvergleich mit HPLC*</b>	Metanephrin	HPLC = 0.9 ELISA - 0.8	r = 0.99; n = 40
* Die Werte wurden mit der ELISA- und HPLC-Methode (externe QC-Proben von UK-NEQUAS) bestimmt. Die Korrelation zwischen ELISA und HPLC ist ausgezeichnet. Es ist zu beachten, dass die UK-NEQUAS Kontrollwerte dem Mittelwert der von ca. 40 verschiedenen HPLC-Anwendern angegebenen Werte entsprechen und immer eine pathologische Probe pro Aussendung enthalten.			

## 9. Referenzen/Literatur

- (1) Parrott et al. Urinary corticosterone and normetanephrine levels after voluntary wheel and forced treadmill running in the db/db mouse. *Journal of Diabetes Mellitus*, 1(4):71-78 (2011)
- (2) Petramala et al. Multiple Catecholamine-Secreting Paragangliomas: Diagnosis after Hemorrhagic Stroke in a Young Woman. *Endocrine Practice*, 14(3):340-346 (2008)
- (3) Sato et al. Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nature Medicine*, 13:1234-1240 (2007)

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

### Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Tests
	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		