
Instructions for use
Normetanephrine Plasma ELISA

REF

DEE8200



IVD



1. Introduction


1.1 Intended use and principle of the test

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

First, the plasma proteins are removed by precipitation. After this Normetanephrine (Normetadrenaline) 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 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-forms. 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.
- (9) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.

- (10) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.
- (11) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (12) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (13) A standard curve must be established for each run.
- (14) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report.
- (15) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (16) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (17) Some reagents contain sodium azide (NaN₃) as preservative. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water. NaN₃ may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. When disposing reagents, flush with a large volume of water to avoid azide build-up.
- (18) 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.
- (19) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheet (MSDS). The Material Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (20) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (21) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
- (22) 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

Serum/Plasma

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

2.2.2 Drug interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of Normetanephrine 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 1 month when stored at 2 - 8 °C. Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly with desiccant again.

4. Materials

4.1 Content of the kit

BA D-0023	REAC-TUBES	Reaction Tubes - Ready to use
Content:	Reaction Tubes in a resealable pouch.	
Volume:	2 x 50 tubes	
BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Ready to use
Content:	Adhesive Foils in a resealable pouch.	
Volume:	1 x 4 foils	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate - Concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH.	
Volume:	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
- BA E-0231** **NAD NMN** **Normetanephrine Microtiter Strips** - Ready to use
 Content: 1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable yellow pouch with desiccant.
- BA E-8210** **NMN-AS** **Normetanephrine Antiserum** - Ready to use
 Content: Anti- Normetanephrine rabbit antibody, yellow coloured.
 Volume: 1 x 6 ml/vial, yellow cap
- BA E-8313** **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** - Ready to use
 Content: TRIS-buffer containing proteins and a non-mercury preservative.
 Volume: 1 x 12 ml/vial, orange cap
- BA R-0028** **EQUA-REAG** **Equalizing Reagent** - Lyophilized
 Content: Human serum, negative for HIV I/II, HBsAg and HCV
 Volume: 2 vials, dark green cap

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration	Concentration	Volume/ Vial
			pg/ml NMN	pmol/l NMN	
BA R-8301	STANDARD A	white	0	0	12 ml
BA R-8302	STANDARD B	light yellow	48	262	4 ml
BA R-8303	STANDARD C	orange	160	874	4 ml
BA R-8304	STANDARD D	dark blue	480	2 621	4 ml
BA R-8305	STANDARD E	light grey	1 600	8 736	4 ml
BA R-8306	STANDARD F	black	4 800	26 208	4 ml
BA R-8351	CONTROL 1	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!		4 ml
BA R-8352	CONTROL 2	dark red			4 ml

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

Content: Buffer with stabilizer and a precipitating reagent spiked with a defined quantity of Normetanephrine

Hazards identification:



H302 Harmful if swallowed.

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.

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

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 25 - 500 µl; 3 ml; 10 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
- Centrifuge capable of at least 3.000 x g
- 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

EDTA-, Citrate- or Heparin-Plasma

Whole blood should be collected into centrifuge tubes (Monovette™ or Vacuette™) containing EDTA, heparin or citrate 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 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

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.

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

 *In case of overflow, read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 405 nm.*

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

Equalizing Reagent

Reconstitute the Equalizing Reagent with 10 ml water (deionized, distilled, or ultra-pure).

Reconstituted Equalizing Reagent which is not used immediately has to be stored in aliquots for max. 1 month at -20 °C and may be thawed only once.

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!

6.2 Precipitation

- | | |
|----|---|
| 1. | Pipette 100 µl of standards , 100 µl of controls , and 500 µl of plasma samples into the respective Reaction Tubes . |
| 2. | Add 500 µl Equalizing Reagent (<i>refer to 6.1</i>) to all tubes containing standards and controls. |
| 3. | Add 100 µl Standard A to all tubes containing plasma samples. |
| 4. | Mix Reaction Tubes thoroughly (vortex) and centrifuge for 15 minutes at 3,000 x g . |

 Take **25 µl** of the clear supernatant for the Normetanephrine ELISA.

6.3 Normetanephrine ELISA

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

7. Calculation of results

Measuring range	Normetanephrine
	23 – 4 800 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).

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 Equalizing Reagent (BA R-0028) and have to be re-assayed.

Conversion

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

Expected reference value

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

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the Normetanephrine ELISA ^{Fast Track} the following value is observed:

Normetanephrine
< 180 pg/ml

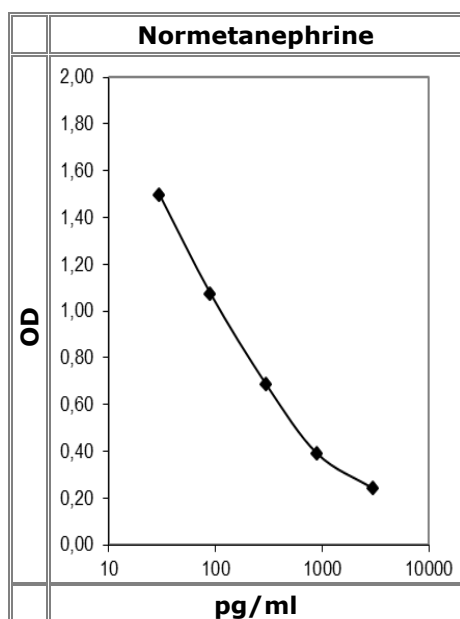
7.1 Quality control

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

Analytical Sensitivity (Limit of Detection)		Normetanephrine
	Plasma	23 pg/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)
		Normetanephrine
	Derivatized Normetanephrine	100
	Derivatized Metanephrine	0.08
	3-Methoxytyramin.HCl	1.74
	Adrenaline	< 0.001
	Noradrenaline	< 0.001
	Dopamin.HCl	< 0.001
	VMS	< 0.001
	HMVS	< 0.001
	L-DOPA	< 0.001
	L-Tyrosin	< 0.001
	Tyramine.HCl	< 0.001
	Normetanephrine	< 0.001
	Acetaminophen	< 0.001

Precision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Sample	Range (pg/ml)	CV (%)		Sample	Range (pg/ml)	CV (%)
Normetanephrine	1	167 ± 12	7.3	Normetanephrine	1	161 ± 18	11
	2	373 ± 29	7.8		2	370 ± 19	5.1
	3	832 ± 60	7.2		3	844 ± 51	6.0

Linearity			Range	Serial dilution up to	Mean (%)
	Normetanephrine	Plasma	58 - 5800	1: 129	109

Recovery			Mean (%)	Range (%)	% Recovery after spiking
	Normetanephrine	Plasma	92	80 - 108	







Method Comparison ELISA vs. LC-MS/MS	Normetanephrine	Plasma	LC-MS/MS = 1.2x + 10.5	r = 0.99; n = 59
---	-----------------	--------	------------------------	------------------

9. References/Literature

- (1) Jeyaraman et al. The role of urinary fractionated metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma. The Indian Journal of Medical Research, 137(2):316-323 (2013)
- (2) Unger et al. Plasma and Urinary Metanephrines Determined by an Enzyme Immunoassay, but not Serum Chromogranin A for the Diagnosis of Pheochromocytoma in Patients with Adrenal Mass. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 120:494-500 (2012)
- (3) Stefanescu et al. Salivary free catecholamines metabolites as possible biochemical markers in pheochromocytoma diagnosis. Acta Endocrinologica (Buc), VII (4): 431-442 (2011)

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

Symbols:

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

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von freiem Normetanephrin in Plasma.

Im Verlauf der Probenvorbereitung wird Metanephrin nach einer Proteinfällung in sein entsprechendes 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 Antikörper, welcher in diesem Testkit verwendet wird, erkennt lediglich die biologisch relevante L-Form der Metanephriine. 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 Metanephriine eingesetzt werden, um natürliche Proben anzureichern! Da nur etwa 50% dieser synthetischer D-/L-Metanephriine – nämlich nur die L-Form - mit dem Testkit detektiert werden können, werden angereicherte Proben zu niedrig gemessen. Deshalb sollten nur natürliche Proben verwendet werden

1.2 Klinische Anwendung

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

Aktuelle Studien und Publikationen zeigen, dass die Quantifizierung der freien Metanephriine sowie der freien Normetanephriine 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 abbrechbare Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
- (9) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (10) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (11) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Vertiefungen sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (12) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (13) Bei jeder Testanwendung muss eine Kalibrierkurve erstellt werden.
- (14) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (15) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (16) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (17) Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (NaN₃) als Konservierungsmittel. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen. NaN₃ kann mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung der Reagenzien mit reichlich Wasser spülen, um die Ansammlung von Azid zu vermeiden.
- (18) 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.
- (19) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe Sicherheitsdatenblatt (MSDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (20) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (21) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.
- (22) 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

Serum/Plasma

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

Bislang sind keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des Normetanephrin-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 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-0023	REAC-TUBES	Reaction Tubes - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Reaktionsröhrchen in einem wiederverschließbaren Beutel	
Volumen:	2 x 50 Röhrchen	
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	
BA E-0231	NAD NMN	Normetanephine Microtiter Strips - Gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiter Streifen mit Trockenmittelbeutel in einem gelben wiederverschließbaren Beutel	
BA E-8210	NMN-AS	Normetanephine Antiserum - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Anti- Normetanephin Kaninchen Antikörper, gelb gefärbt	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel gelb	
BA E-8313	ASSAY-BUFF	Assay Buffer - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Proteinhaltiger Puffer mit quecksilberfreien Stabilisatoren	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel orange	
BA R-0028	EQUA-REAG	Equalizing Reagent - Lyophilisiert
Inhalt:	Humanserum, negativ auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet	
Volumen:	2 Fläschchen, Deckel dunkelgrün	
BA R-8312	ACYL-CONC	Acylation Concentrate – Konzentriert
Inhalt:	Acylierungsreagenz in DMSO	
Volumen:	1 x 1,5 ml/Fläschchen, Deckel dunkelgrau	
Mögliche Gefahren:		H302 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration	Konzentration	Volumen/ Fläschchen
			pg/ml	pmol/l	
			NMN	NMN	
BA R-8301	STANDARD A	weiß	0	0	12 ml
BA R-8302	STANDARD B	hellgelb	48	262	4 ml
BA R-8303	STANDARD C	orange	160	874	4 ml
BA R-8304	STANDARD D	dunkelblau	480	2621	4 ml
BA R-8305	STANDARD E	hellgrau	1600	8736	4 ml
BA R-8306	STANDARD F	schwarz	4800	26208	4 ml
BA R-8351	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.		4 ml
BA R-8352	CONTROL 2	dunkelrot			4 ml

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

Inhalt: Normetanephrin in einem Puffer mit Stabilisatoren und einem Fällungsreagenz. Hergestellt durch Aufstockung des Puffers mit einer definierten Menge an Normetanephrin.

Mögliche Gefahren:



H302 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

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

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 25 – 500 µl; 3 ml; 10 ml
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 – 650 nm-Filter
- Zentrifuge (min. 3000 x g)
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Saugfähige Unterlage
- Vortex-Mischer
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)

5. Probenmaterial und Lagerung

EDTA-, Citrat- oder Heparin-Plasma

Das durch Venenpunktion entnommene Vollblut in einem für EDTA-, Citrat- 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.

6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht **und vorsichtig durchmischt** werden. 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 höher werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassays ist zwischen 20 – 25 °C.

 *Liegt die gemessene Absorption außerhalb des Messbereichs, so muss innerhalb von 10 Minuten die Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei 405 nm gemessen werden.*

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

Ausgleichsreagenz


Den Inhalt eines Fläschchen **EQUA-REAG** (BA R-0028) mit 10 ml Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) lösen. Rekonstituiertes Ausgleichsreagenz, welches nicht benötigt wird, sollte umgehend in Aliquots für max. 1 Monat bei -20 °C gelagert werden (nur einmal auftauen).

Azylierungslösung


Da die gebrauchsfertige Azylierungslösung 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!

6.2 Präzipitation

1.	Jeweils 100 µl der Standards und Kontrollen , sowie 500 µl der Plasmaproben in die entsprechenden REAC-TUBES pipettieren.
2.	Jeweils 500 µl Ausgleichsreagenz (siehe 6.1) zu den REAC-TUBES mit den Standards und Kontrollen hinzugeben.
3.	Zu den REAC-TUBES , die die Plasmaproben enthalten, jeweils 100 µl STANDARD A hinzugeben.
4.	REAC-TUBES sorgfältig mischen (Vortex) und für 15 Min bei 3000 x g zentrifugieren.
	Vom klaren Überstand werden 25 µl für den Normetanephrin ELISA benötigt.

6.3 Normetanephrin ELISA

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

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Normetanephrin
	23 – 4800 pg/ml

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannt 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.

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

Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards F gefunden werden, müssen mit dem Ausgleichsreagenz (BA R-0028) entsprechend verdünnt und nochmals bestimmt werden.

Umrechnung

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

Erwarteter Referenzwert

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

In einer Studie wurden Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergab sich mit dem Normetanephrin ELISA ^{Fast Track} folgender Wert:

Normetanephrin
< 180 pg/ml

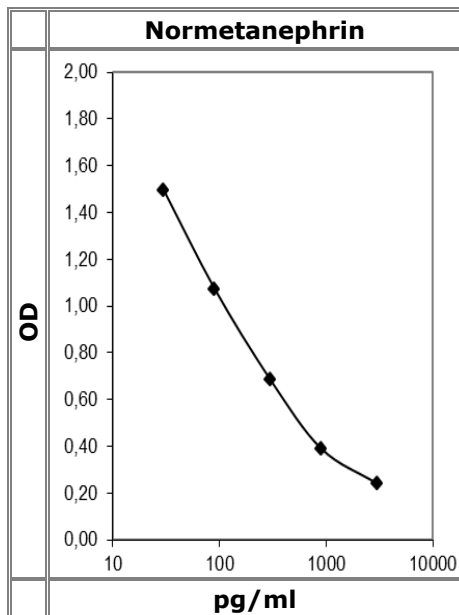
7.1 Qualitätskontrolle

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 unbekannt 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

Analytische Sensitivität (Limit of Detection)		Normetanephrin
	Plasma	23 pg/ml

Spezifität (Cross Reactivity)	Substanz	Kreuzreaktion (%)
		Normetanephrin
	Derivatisiertes Normetanephrin	100
	Derivatisiertes Metanephrin	0,08
	3-Methoxytyramin.HCl	1,74
	Adrenalin	< 0,001
	Noradrenalin	< 0,001
	Dopamin.HCl	< 0,001
	VMS	< 0,001
	HMVS	< 0,001
	L-DOPA	< 0,001
	L-Tyrosin	< 0,001
	Tyramine.HCl	< 0,001
	Normetanephrin	< 0,001
	Acetaminophen	< 0,001

Präzision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Probe	Bereich (pg/ml)	CV (%)		Probe	Bereich (pg/ml)	CV (%)
Normetanephrin	1	167 ± 12	7,3	Normetanephrin	1	161 ± 18	11
	2	373 ± 29	7,8		2	370 ± 19	5,1
	3	832 ± 60	7,2		3	844 ± 51	6,0

Linearität			Bereich (pg/ml)	Serielle Verd. bis zu	Mittelwert (%)
	Normetanephrin	Plasma	58 – 5800	1: 129	109

Wiederfindung			Mittelwert (%)	Bereich (%)	% Wiederfindung nach Aufstockung
	Normetanephrin	Plasma	92	80 – 108	







Methodenvergleich: ELISA vs. LC-MS/MS	Normetanephrin	Plasma	LC-MS/MS = 1,2x+10,5	r = 0,99; n = 59

9. Referenzen/Literatur

- (1) Jeyaraman et al. The role of urinary fractionated metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma. The Indian Journal of Medical Research, 137(2):316-323 (2013)
- (2) Unger et al. Plasma and Urinary Metanephrines Determined by an Enzyme Immunoassay, but not Serum Chromogranin A for the Diagnosis of Pheochromocytoma in Patients with Adrenal Mass. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 120:494-500 (2012)
- (3) Stefanescu et al. Salivary free catecholamines metabolites as possible biochemical markers in pheochromocytoma diagnosis. Acta Endocrinologica (Buc), VII (4): 431-442 (2011)

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

Symbole:

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