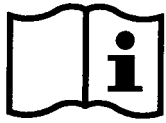


Product information



Information about other products is available at: www.demeditec.com



Metanephrine Plasma ELISA



DEE8100



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

Table of contents

1.	Introduction	5
1.1	Intended use and principle of the test	5
1.2	Clinical application	5
2.	Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations	5
2.1	Procedural cautions, guidelines and warnings	5
2.2	Limitations	6
2.2.1	Interfering substances and proper handling of specimens	6
2.2.2	Drug and food interferences	6
2.2.3	High-Dose-Hook effect	6
3.	Storage and stability	6
4.	Materials	7
4.1	Contents of the kit	7
4.2	Calibration and Controls	9
4.3	Additional materials required but not provided in the kit	9
4.4	Additional equipment required but not provided in the kit	9
5.	Sample collection, handling and storage	9
6.	Test procedure	9
6.1	Preparation of reagents and further notes	10
6.2	Preparation of samples – Extraction	10
6.3	Metanephrine ELISA	11
7.	Calculation of results	11
7.1	Expected reference value	12
7.2	Typical standard curve	12
8.	Control samples	12
9.	Assay characteristics	12
9.1	Performance data	12
9.2	Metrological Traceability	14
10.	References/Literature	14
11.	Changes	15

1.	Einleitung	16
1.1	Verwendungszweck und Testprinzip	16
1.2	Klinische Anwendung	16
2.	Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen	16
2.1	Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen	16
2.2	Grenzen des Tests	17
2.2.1	Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben	17
2.2.2	Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel	17
2.2.3	High-Dose-Hook Effekt	18
3.	Lagerung und Haltbarkeit	18
4.	Materialien	18
4.1	Reagenzien im Kit	18
4.2	Kalibratoren und Kontrollen	20
4.3	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien	20
4.4	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte	20
5.	Probensammlung, -behandlung und -lagerung	20
6.	Testdurchführung	21
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise	21
6.2	Probenvorbereitung – Extraktion	21
6.3	Metanephrin ELISA	22
7.	Berechnung der Ergebnisse	22
7.1	Erwartete Referenzbereiche	23
7.2	Typische Standardkurve	23
8.	Kontrollproben	23
9.	Assaycharakteristika	24
9.1	Leistungsdaten	24
9.2	Metrologische Rückführbarkeit	25
10.	Referenzen/Literatur	25
11.	Änderungen	26

Tabla de contenidos

1.	Introducción	27
2.	Precauciones, directrices, advertencias y limitaciones de procedimiento	27
3.	Almacenamiento y estabilidad	29
4.	Materiales	29
5.	Recolección, manipulación y almacenamiento de muestras	32
6.	Procedimiento de ensayo	32
7.	Cálculo de resultados	34
8.	Muestras de control	35
9.	Características del ensayo	35
10.	Referencias/Literatura	37
11.	Cambios	38
Symbols used with Demeditec Assays		40

Related Products:

- Normetanephrine Plasma ELISA
- Nephtrines Plasma ELISA

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

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of free metanephrine in plasma. The determination of metanephrine helps in the detection of paragangliomas and pheochromocytomas. 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 compete with the solid phase bound analytes for a fixed number of antibody binding sites. After the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antibody complexes are removed by washing. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate resulting in a colour reaction. The reaction is monitored at a wavelength of 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standard concentrations. Manual processing of the ELISA is recommended. The use of automatic laboratory equipment is the responsibility of the user. This in-vitro diagnostic is for professional use only.

1.2 Clinical application

Metanephrine and normetanephrine are the metabolites of the catecholamines epinephrine and norepinephrine, respectively [1]. Cells derived from neuroendocrine tumors (e.g. pheochromocytoma and paraganglioma) are known to produce catecholamines, which are secreted episodically via vesicles into the blood stream [2, 3]. But beside this, a small portion of the catecholamines is metabolized inside the tumor cells to the corresponding catecholamines metabolites – namely metanephrine, normetanephrine (and 3-methoxytyramine in the case of dopamine) – which are secreted at low levels continuously into the blood stream [4, 5]. Recent studies and publications have shown that the quantification of these plasma free metanephrines and plasma free normetanephrines is the most accurate biochemical marker for the clinical diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma in patients [5-13]. Pheochromocytoma and paraganglioma are rare neuroendocrine tumors and occur with an estimated annual incidence of 1 – 8 cases per 1,000,000 [10, 14].

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone, even if these results are assessed in accordance with the quality criteria of the method. 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.

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 must 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) must be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) If serious incidents should occur in connection with this product, they should be reported to the manufacturer and the competent national authorities.
- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 – 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.
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended.
- (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 for use 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 provided with the kit.
- (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 H₂SO₄. 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. Rinse contaminated items before reuse.
- (17) For information about 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) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.
- (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) 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.
- (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) 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.

2.2 Limitations

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

Commercially available synthetic metanephrine is always a mixture of the D- and L-form. This has important implications if synthetic metanephrine is used to enrich native samples. The antibody used in this kit has a specific D- and L-form recognition rate. Please contact the manufacturer for details in case synthetic metanephrine was used to enrich native samples.

2.2.1 Interfering substances and proper handling of specimens

Samples containing precipitates or fibrin strands might cause inaccurate results.

Hemolytic samples (up to 0.5 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 0.5 mg/ml bilirubin) and lipemic samples (up to 17 mg/ml triglycerides) have no influence on the assay results.

If the concentrations cannot be estimated and there are doubts as to whether the above limit values for hemolytic, icteric or lipemic samples are complied with, the samples should not be used in the assay.

2.2.2 Drug and food interferences

Medications like antihypertensive agents, antidepressants, antipsychotics, sympathomimetics and L-DOPA can influence plasma metanephrines levels. Caffeinated beverages, nicotine, and mood-enhancing drugs can also affect plasma metanephrines levels. In addition, stress and physical strain should be avoided shortly before sampling.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

Store kit and reagents at 2 – 8 °C until expiration date. Do not use kit and 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 of the ELISA plate has been opened, care should be taken to close it tightly again including the desiccant.

4. Materials**4.1 Contents of the kit**

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil – ready to use
Content:	Adhesive foils in a resealable pouch	
Number:	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, 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	
Description:	Species is goat	
Hazard pictograms:		
	GHS07	
Signal word:	Warning	
Hazardous ingredients:	2-methyl-2H-isothiazol-3-one	
Hazard statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.	
Precautionary statements:	P280 Wear protective gloves. P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate – ready to use
Content:	Chromogenic substrate containing 3,3',5,5'-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, grey cap	
BA E-0131	W 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-8110	MN-AS	Metanephrine Antiserum – ready to use
Content:	Rabbit anti-metanephrine antibody in buffer with proteins and non-mercury preservative, blue coloured	
Volume:	1 x 6 ml/vial, blue cap	
Description:	Species of antibody is rabbit, species of protein in buffer is bovine	
BA E-8327	ADJUST-BUFF	Adjustment Buffer – ready to use
Content:	TRIS buffer	
Volume:	1 x 10 ml/vial, yellow cap	
BA R-8312	ACYL-CONC	Acylation Concentrate – concentrated
Content:	Acylation reagent in DMSO	
Volume:	1 x 1.5 ml/vial, white cap	

Hazard pictograms:	 
	GHS05 GHS08
Signal word:	Danger
Hazardous ingredients:	Succinic anhydride
Hazard statements:	H314 Causes severe skin burns and eye damage. H317 May cause an allergic skin reaction. H334 May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.
Precautionary statements:	P260 Do not breathe mist/vapours/spray. P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection. P303+P361+P353 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water. P304+P340 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. P310 Immediately call a POISON CENTER/doctor. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.
EUH-statements:	EUH071 Corrosive to the respiratory tract.
BA R-8313	ASSAY-BUFF Assay Buffer – ready to use
Content:	25% organic solvent
Volume:	1 x 30 ml/vial, orange cap
Hazard pictograms:	
	GHS02
Signal word:	Warning
BA R-8318	EXTRACT-PLATE Extraction Plate – ready to use
	96
Content:	1 x 96 well plate, precoated with ion-exchanger in a resealable pouch
BA R-8325	CLEAN-CONC 25X Cleaning Concentrate – concentrated 25x
Content:	Buffer with sodium acetate
Volume:	1 x 20 ml/vial, brown cap
BA R-8326	ELUTION-BUFF Elution Buffer – ready to use
Content:	0.1 M sodium hydroxide, dark purple coloured
Volume:	1 x 14 ml/vial, green cap
Hazard pictograms:	
	GHS05
Signal word:	Danger
Hazard statements:	H314 Causes severe skin burns and eye damage.
Precautionary statements:	P280 Wear protective gloves, protective clothing, eye protection. P303+P361+P353 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water. P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P310 Immediately call a doctor, a POISON CENTER. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.
BA R-8828	EQUA-REAG Equalizing Reagent – ready to use

Content: Human serum, negative for HIV I/II, HBsAg and HCV
 Volume: 1 x 14 ml/vial, white cap
 Description: Species is human

4.2 Calibration and Controls

Standards and Controls – ready to use

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

4.3 Additional materials required but not provided in the kit

- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Absorbent material (paper towel)

4.4 Additional 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)
- Vortex mixer

5. Sample collection, handling and storage

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. When in doubt, it is recommended that hemolytic, icteric, and lipemic samples not be used in the assay (see 2.2.1).

Storage: up to 3 days at 2 – 8 °C, for longer period (up to 6 months) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

6. Test procedure

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

The binding of the 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.

If the product is prepared in parts, unused wells in Extraction Plates should be covered to avoid contamination. After preparation, the used wells must be labelled to prevent double use.

During the overnight incubation at 2 – 8 °C with the antiserum, the temperature should be uniform all over the ELISA plate to avoid any drift and edge-effect.

⚠ The use of a microtiter plate shaker with the following specifications is mandatory: shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm. Shaking with differing settings might influence the results.

6.1 Preparation of reagents and further notes

Wash Buffer

Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate **WASH-CONC** **50X** with water to a final volume of 1000 ml.
Storage: 2 months at 2 – 8 °C

Cleaning Buffer

Dilute the 20 ml Cleaning Concentrate **CLEAN-CONC** **25X** with water to a final volume of 500 ml.
Storage: 2 months 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.

Extraction Plate

In rare cases residues of the cation exchanger can be seen in the wells as small, black dots or lines. These residues do not influence the quality of the product.

6.2 Preparation of samples – Extraction

The following extraction procedure can be run with 200 µl or 250 µl of plasma sample.

The procedure for 250 µl plasma is highlighted in grey and italicised and may be used in case higher supernatant volumes for pipetting to the subsequent ELISA are preferred.

The ELISA procedure itself is not affected by this alternative protocol.

1.	Pipette 20 µl of standards and controls into the respective wells of the EXTRACT-PLATE 96 .
	<i>Alternatively pipette 25 µl of standards and controls.</i>
2.	Add 20 µl STANDARD A to all wells intended for the plasma samples .
	<i>Alternatively add 25 µl STANDARD A.</i>
3.	Add 200 µl of EQUA-REAG to the wells with standards and controls .
	<i>Alternatively add 250 µl of EQUA-REAG.</i>
4.	Pipette 200 µl of plasma samples to the respective wells.
	<i>Alternatively pipette 250 µl of plasma samples.</i>
5.	Incubate plate for 2 h at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
6.	Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
7.	Pipette 250 µl of ASSAY-BUFF into all wells. Incubate the plate for 5 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Wash the plate 3 times by adding 350 µl of Cleaning Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
9.	Pipette 100 µl of ELUTION-BUFF into all wells.
	<i>Alternatively pipette 125 µl of ELUTION-BUFF.</i>
	<i>Please note: The colour changes caused by the elution buffer can vary between standards and samples.</i>
10.	Cover plate with FOILS . Incubate 15 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
⚠	Remove the FOILS .
	Do not decant the supernatant thereafter!
	The following volume of the supernatant is needed for the subsequent ELISA:
	Metanephrine 50 µl

6.3 Metanephrine ELISA

1.	Pipette 25 µl of ADJUST-BUFF into all wells of the Metanephrine Microtiter Strips ADR MN .
2.	Pipette 50 µl of the extracted standards, controls and samples into the respective wells. <i>Please hold the Extraction Plate at a slight angle in order to facilitate this pipetting step.</i>
3.	Preparation of Acylation Solution : Pipette 80 µl ACYL-CONC to 3 ml water and mix thoroughly.
4.	Pipette 25 µl of the freshly prepared Acylation Solution into all wells.
5.	Incubate for 15 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
6.	Pipette 50 µl of the Metanephrine Antiserum MN-AS into all wells.
7.	Cover the plate with FOILS , 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 times 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 CONJUGATE into all wells.
10.	Incubate for 30 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
11.	Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 times 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-SOLN to all wells and shake the microtiter plate shortly.
14.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 min, 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	Metanephrine
	15.1 – 3,600 pg/ml

The standard curve, which can be used to determine the concentration of the unknown samples, 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) using a concentration of 0.001 pg/ml for Standard A (this alignment is mandatory because of the logarithmic presentation of the data). Use 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. Samples found with concentrations higher than the highest standard (Standard F) should be diluted accordingly with the included Equalizing Reagent **EQUA-REAG** and must be re-assayed. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Conversion:

metanephrine [pg/ml] x 5.07 = metanephrine [pmol/l]

7.1 Expected reference value

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

The expected reference values indicated below are based on method comparison studies to LC-MS/MS [2] with blood samples taken in the sitting position.

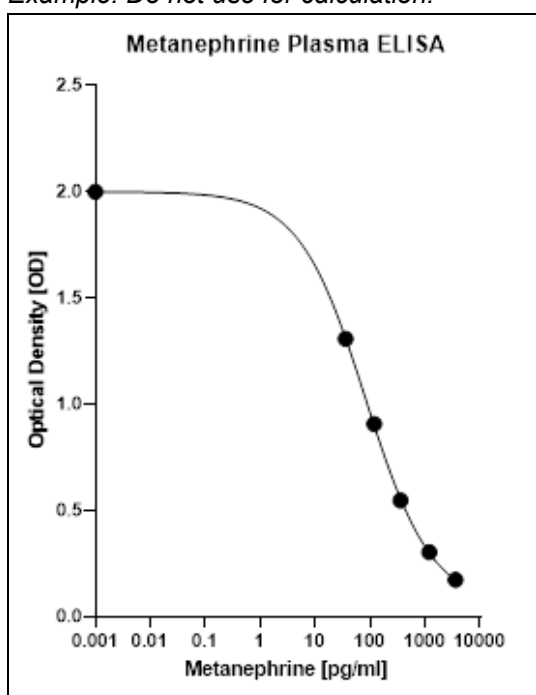
	Metanephrine
expected reference value (ULN)	< 100 pg/ml
typical pathological range	up to 3,534 pg/ml

For the interpretation of the results, a grey area has to be considered. This grey area does not depend on the methodology used and is reflected in a slight to moderate increase in metanephrine and normetanephrine up to 4 times the upper cut-off [15]. 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. If the sample continues to be found in the grey area, a clonidine suppression test may be considered [16, 17].

7.2 Typical standard curve

⚠ *Example: Do not use for calculation!*



8. Control samples

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. Commercially obtained control samples should be treated like unknown samples. Control samples should fall within established confidence limits (please refer to "Limitations" chapter 2.2). The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC-Report.

9. Assay characteristics

9.1 Performance data

Analytical Sensitivity	
	Metanephrine
Limit of Blank (LOB)	9.9 pg/ml
Limit of Detection (LOD)	14.9 pg/ml
Limit of Quantification (LOQ)	15.1 pg/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	
Substance	Cross Reactivity [%]
	Metanephrine
Metanephrine	100
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
Acetaminophen	< 0.01

Precision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Sample	Mean [pg/ml]	CV [%]		Sample	Mean [pg/ml]	CV [%]
Metanephrine	1	66.3	11.4	Metanephrine	1	67.8	17.6
	2	122	13.5		2	134	12.7
	3	308	10.6		3	319	11.0
	4	783	9.2		4	847	7.5

Lot-to-Lot			
	Sample	Mean ± SD [pg/ml]	CV [%]
Metanephrine (n = 6)	1	97.7 ± 16.5	16.9
	2	870 ± 117	13.5

Recovery was determined according to the CLSI standard EP 34 1st ed.

Recovery			
	Range [pg/ml]	Mean [%]	Range [%]
Metanephrine	20.9 – 1,291	102	90 – 109

Linearity			
	Serial dilution up to	Mean [%]	Range [%]
Metanephrine	1:64	107	101 – 124

Method Comparison: ELISA vs. LC-MS/MS [13]	
Metanephrine	$y = 0.91x + 1.8$; $r^2 = 0.96$; $n = 46$

Diagnostic Performance [2]*				
	Diagnostic Specificity [%]	Diagnostic Sensitivity [%]	Positive Predictive Value (PPV) [%]	Negative Predictive Value (NPV) [%]
Metanephrine	96	45	79	84
	Positive Likelihood Ratio (LR+)		Negative Likelihood Ratio (LR-)	
	11.25		0.57	

*The determination of both metanephrine and normetanephrine, using the Nephries Plasma ELISA DEE8300, results in a better diagnostic performance (diagnostic sensitivity 100% and diagnostic specificity 96%).

9.2 Metrological Traceability

The values assigned to the standards and controls of the Metanephrine Plasma ELISA are traceable to SI Units by weighing with quality-controlled analyte.

Standards and Controls	
	Uncertainty [%]
Metanephrine	2.7

Metanephrine Plasma ELISA	
	Expanded Uncertainty [%] k = 2*
Metanephrine	26.0

*This defines an interval about the measured result that will include the true value with a probability of 95%.

10. References/Literature

1. Lee, S.M., et al., *Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of plasma metanephrines for differential diagnosis of adrenal incidentaloma*. Ann Lab Med, 2015. **35**(5): p. 519-22.
2. Peaston, R.T., et al., *Performance of plasma free metanephrines measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of pheochromocytoma*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(7-8): p. 546-52.
3. de Jong, W.H., et al., *Dietary influences on plasma and urinary metanephrines: implications for diagnosis of catecholamine-producing tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(8): p. 2841-9.
4. Boot, C., et al., *Single-centre study of the diagnostic performance of plasma metanephrines with seated sampling for the diagnosis of phaeochromocytoma/paraganglioma*. Ann Clin Biochem, 2017. **54**(1): p. 143-148.
5. Shen, Y., et al., *A simple and robust liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for determination of plasma free metanephrines and its application to routine clinical testing for diagnosis of pheochromocytoma*. Biomed Chromatogr, 2019. **33**(10): p. e4622.
6. Anas, S.S. and S.D. Vasikaran, *An audit of management of patients with borderline increased plasma-free metanephrines*. Ann Clin Biochem, 2010. **47**(Pt 6): p. 554-8.
7. Eisenhofer, G., et al., *Plasma metanephrines in renal failure*. Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 668-77.
8. Eisenhofer, G., et al., *Pheochromocytoma catecholamine phenotypes and prediction of tumor size and location by use of plasma free metanephrines*. Clin Chem, 2005. **51**(4): p. 735-44.
9. Eisenhofer, G., et al., *Biochemical Diagnosis of Chromaffin Cell Tumors in Patients at High and Low Risk of Disease: Plasma versus Urinary Free or Deconjugated O-Methylated Catecholamine Metabolites*. Clin Chem, 2018. **64**(11): p. 1646-1656.
10. Grouzmann, E., et al., *Diagnostic accuracy of free and total metanephrines in plasma and fractionated metanephrines in urine of patients with pheochromocytoma*. Eur J Endocrinol, 2010. **162**(5): p. 951-60.
11. Pussard, E., A. Chaouch, and T. Said, *Radioimmunoassay of free plasma metanephrines for the diagnosis of catecholamine-producing tumors*. Clin Chem Lab Med, 2014. **52**(3): p. 437-44.
12. Unger, N., et al., *The value of immunoassays for metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytomas*. Horm Metab Res, 2009. **41**(9): p. 676-9.
13. de Jong, W.H., et al., *Plasma free metanephrine measurement using automated online solid-phase extraction HPLC tandem mass spectrometry*. Clin Chem, 2007. **53**(9): p. 1684-93.

14. Mullins, F., et al., *Enzyme-linked immunoassay for plasma-free metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma in adults is not ideal*. Clin Chem Lab Med, 2011. **50**(1): p. 105-10.
15. Eisenhofer, G., et al., *Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true- from false-positive test results*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2656-66.
16. Remde, H., et al., *Improved Diagnostic Accuracy of Clonidine Suppression Testing Using an Age-Related Cutoff for Plasma Normetanephrine*. Hypertension, 2022. **79**(6): p. 1257-1264.
17. Bartsch, D.K. and K. Lorenz. *S2k-Leitlinie - Operative Therapie von Nebennierentumoren 2017*; Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/088-008I_S2k_Operative-Therapie_Nebennierentumoren_2019-07.pdf.

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

11. Changes

Version	Release Date	Chapter	Change
20.0	2022-03-25	All	- The alternative version, 2 h at RT incubation with antiserum, was removed - The IFU was revised according to the IVDR regulations (EU) 2017/746 - Sample stability (chapter 5) changed - Expected reference value (ULN) changed (chapter 7.1) - Typical pathological range was added (Chapter 7.1) - LOB, Lot to Lot and diagnostic performance were added to the assay characteristics (chapter 9.1) - Metrological traceability was added (chapter 9.2) - References/Literature was updated (chapter 10)
21.0	2023-09-18	2.1/9.2 4.1 7.1 9.1 10	- Editorial changes - Hazard labelling updated according to SDS - Hint added regarding clonidine suppression test - Recovery updated - References updated
22.0	2024-12-19	4.1 7 9.2	- Hazard labelling BA E-0040 updated according to SDS - Note added to the dilution factor in the calculation - Metrological Traceability updated

Zugehörige Produkte:

- Normetanephrene Plasma ELISA
- Nephrienes Plasma ELISA

1. Einleitung**1.1 Verwendungszweck und Testprinzip**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von freiem Metanephrin in Plasma. Die Bestimmung von Metanephrin hilft bei der Erkennung von Paragangliomen und Phäochromozytomen.

Metanephrin (Metadrenalin) wird mittels eines Ionenaustauschergels 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 Analyten konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörperkomplexe durch Waschen entfernt. Der an die feste Phase gebundene Antikörper wird mit einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen-Antikörper gebunden und mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die Konzentrationen der unbekannten Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen und Abgleich der gemessenen Absorptionen ermittelt. Die manuelle Abarbeitung des ELISAs wird empfohlen. Die Verwendung von automatischen Laborgeräten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Dieses In-Vitro-Diagnostikum ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

1.2 Klinische Anwendung

Metanephrin und Normetanephrin sind Metaboliten der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin [1]. Neuroendokrine Tumorzellen wie z.B. das Phäochromozytom und Paragangliom produzieren und sekretieren episodisch Katecholamine über Vesikel in den Blutstrom [2, 3]. Ein kleiner Teil der Katecholamine wird zudem in den Tumorzellen zu den jeweiligen Katecholaminmetaboliten – nämlich Metanephrin, Normetanephrin (und 3-Methoxytyramin im Falle von Dopamin) – umgewandelt, welche in kleiner Konzentration fortlaufend in den Blutstrom sezerniert werden [4, 5]. Aktuelle Studien und Publikationen zeigen, dass die Quantifizierung der freien Metanephrene sowie der freien Normetanephrene in Plasma klinisch relevante biochemische Marker für die Diagnose von Phäochromozytomen und Paragangliomen sind [5-13]. Phäochromozytome und Paragangliome sind seltene neuroendokrine Tumore und treten mit einer geschätzten jährlichen Inzidenz von 1 – 8 Fällen pro 1.000.000 Einwohner auf [10, 14].

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.

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

- (1) Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Gebrauchsanweisung 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) Geeignete persönliche Schutzausrüstung (Kittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille) ist zu tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Falls in Zusammenhang mit diesem Produkt schwerwiegende Vorfälle auftreten sollten, sollen diese dem Hersteller und den zuständigen nationalen Behörden gemeldet werden.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Verwenden Sie für Verdünnungs- oder Rekonstitutionszwecke deionisiertes, destilliertes oder ultrareines Wasser. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über einzeln herausnehmbare und abbrechbare Streifen. Ungenutzte Wells müssen bei 2 – 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.
- (8) Proben sollten in Doppelbestimmung gemessen werden.
 - (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 Wells 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 Standardkurve erstellt werden.
 - (13) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen der Kitkontrollen 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 H₂SO₄ 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 Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potentiell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
 - (19) Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
 - (20) 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.
 - (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 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.

2.2 Grenzen des Tests

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

Handelsübliches synthetisches Metanephrin ist immer eine Mischung aus der D- und L-Form. Dies hat wichtige Auswirkungen, wenn synthetisches Metanephrin zur Anreicherung nativer Proben verwendet wird. Der in diesem Kit verwendete Antikörper hat eine spezifische D- und L-Form-Erkennungsrate. Bitte kontaktieren Sie den Hersteller für Details, falls synthetisches Metanephrin zur Anreicherung nativer Proben verwendet wurde.

2.2.1 Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben

Proben, die ein Präzipitat oder Fibrinfäden enthalten, können zu ungenauen Ergebnissen führen. Hämolytische Proben (bis zu 0,5 mg/ml Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 0,5 mg/ml Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 17 mg/ml Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse. Sollten die Konzentrationen nicht abzuschätzen sein und Zweifel bestehen, ob die oben genannten Grenzwerte für hämolytische, ikterische oder lipämische Proben eingehalten werden, sollten die Proben nicht im Assay eingesetzt werden.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel

Medikamente wie blutdrucksenkende Mittel, Antidepressiva, Antipsychotika, Sympathomimetika, L-DOPA können die Konzentration der Metanephrine im Plasma beeinflussen. Auch koffeinhaltige

Getränke, Nikotin und stimmungsaufhellende Drogen können die Konzentration der Metanephrine im Plasma beeinflussen. Zudem sollte Stress und körperliche Belastung kurz vor der Probennahme vermieden werden.

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Das Kit muss bei 2 – 8 °C bis zum Verfalldatum gelagert werden. Das Kit und die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfalldatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 2 Monate stabil, wenn sie bei 2 – 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel der ELISA-Platte sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA D-0090	FOILS	Selbstklebende Folie – gebrauchsfertig
Inhalt:	Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Anzahl:	1 x 4 Folien	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Waschpufferkonzentrat – 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel lila	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzymkonjugat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege anti-Kaninchen Immunglobuline, konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot	
Beschreibung:	Spezies ist Ziege	
Gefahren- piktogramme:		
	GHS07	
Signalwort:	Achtung	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	2-Methyl-2H-isothiazol-3-on	
Gefahren- hinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.	
Sicherheits- hinweise:	P280 Schutzhandschuhe tragen. P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stopplösung – gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel grau	
BA E-0131	W ADR MN	Metanephrin Mikrotiterstreifen – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Wells (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem blauen wiederverschließbaren Beutel	
BA E-8110	MN-AS	Metanephrin Antiserum – gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen anti-Metanephrin Antikörper im Proteinpuffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel, blau gefärbt	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau	

Beschreibung:	Spezies vom Antikörper ist Kaninchen, Spezies vom Protein im Puffer ist Rind	
BA E-8327	ADJUST-BUFF	Adjustment Puffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	TRIS-Puffer	
Volumen:	1 x 10 ml/Fläschchen, Deckel gelb	
BA R-8312	ACYL-CONC	Acylierungskonzentrat – konzentriert
Inhalt:	Acylierungsreagenz in DMSO	
Volumen:	1 x 1,5 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
Gefahren- piktogramme:	 	
	GHS05 GHS08	
Signalwort:	Gefahr	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	Bernsteinsäureanhydrid	
Gefahren- hinweise:	H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden.	
Sicherheits- hinweise:	P260 Nebel, Dampf, Aerosol nicht einatmen. P280 Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz tragen. P303+P361+P353 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. P304+P340 BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. P310 Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM, Arzt anrufen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
EUH Sätze:	EUH071 Wirkt ätzend auf die Atemwege.	
BA R-8313	ASSAY-BUFF	Assaypuffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	25% organisches Lösungsmittel	
Volumen:	1 x 30 ml/Fläschchen, Deckel orange	
Gefahren- piktogramme:		
	GHS02	
Signalwort:	Achtung	
BA R-8318	EXTRACT-PLATE	Extraktionsplatte – gebrauchsfertig
	96	
Inhalt:	1 x 96-Well-Platte, beschichtet mit Ionenaustauscher in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA R-8325	CLEAN-CONC 25X	Reinigungskonzentrat – 25x konzentriert
Inhalt:	Natriumacetatpuffer	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel braun	
BA R-8326	ELUTION-BUFF	Eluierungspuffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	0,1 M Natriumhydroxid, dunkellila gefärbt	
Volumen:	1 x 14 ml/Fläschchen, Deckel grün	
Gefahren- piktogramme:		
	GHS05	
Signalwort:	Gefahr	

Gefahrenhinweise:	H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
Sicherheitshinweise:	P280 Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz tragen. P303+P361+P353 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P310 Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM, Arzt anrufen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.

BA R-8828	EQUA-REAG	Ausgleichsreagenz – gebrauchsfertig
Inhalt:	Humanes Serum, negativ auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet	
Volumen:	1 x 14 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
Beschreibung:	Spezies ist Mensch	

4.2 Kalibratoren und Kontrollen

Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration [pg/ml]	Konzentration [pmol/l]	Volumen/ Fläschchen
			MN	MN	
BA E-8301	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA E-8302	STANDARD B	gelb	36	183	4 ml
BA E-8303	STANDARD C	orange	120	608	4 ml
BA E-8304	STANDARD D	blau	360	1.825	4 ml
BA E-8305	STANDARD E	grau	1.200	6.084	4 ml
BA E-8306	STANDARD F	schwarz	3.600	18.252	4 ml
BA E-8351	CONTROL 1	grün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Vertrauensbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.		4 ml
BA E-8352	CONTROL 2	rot			4 ml

Umrechnung: Metanephrin [pg/ml] x 5,07 = Metanephrin [pmol/l]

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

4.3 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien

- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

4.4 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 20 – 350 µl; 3 ml
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer mit 450 nm und, wenn möglich, 620 – 650 nm Filter zur Auswertung von Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplattenschüttler (Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm)
- Vortex-Mischer

5. Probensammlung, -behandlung und -lagerung

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 3 Tage bei 2 – 8 °C; für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Es wird im Zweifel empfohlen hämolytische, ikterische und lipämische Proben nicht im Assay einzusetzen (siehe 2.2.1).

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

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

Die Bindung 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.

Wenn das Produkt in Teilen angesetzt wird, sollen nicht benötigte Wells in Extraktionsplatten abgedeckt werden, um Verschmutzungen zu vermeiden. Nach dem Ansatz müssen die benutzten Wells gekennzeichnet werden, damit eine Doppelnutzung ausgeschlossen wird.

Während der Übernacht-Inkubation mit dem Antiserum bei 2 – 8 °C, sollte über die gesamte ELISA-Platte hinweg eine gleichmäßige Temperatur vorliegen, um jeglichen Drift und Randeffect zu vermeiden.

⚠ *Der verwendete Mikrotiterplattenschüttler muss folgende Spezifikationen haben: Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm. Schütteln mit abweichenden Einstellungen kann die Ergebnisse beeinflussen.*

6.1 Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC** **50X** mit Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

Reinigungspuffer (Cleaning Buffer)

20 ml **CLEAN-CONC** **25X** mit Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml verdünnen.

Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

Acylierungslösung

⚠ Da die Acylierungslösung nur **maximal 3 Minuten haltbar** ist, sollte sie vor Beginn des Assays nicht zubereitet werden. Daher wird seine Vorbereitung im Protokoll in Kapitel 6.3, Schritt 3 und Kapitel 6.4, Schritt 3 beschrieben. Nach Gebrauch entsorgen!

Metanephtrin Mikrotiterstreifen

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

Extraktionsplatte

Vereinzelte Rückstände des Ionenaustauschers in den Wells zu sehen sein (kleine schwarze Punkte oder Linien). Diese stellen keine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes dar.

6.2 Probenvorbereitung – Extraktion

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

Das Protokoll mit 250 µl Plasmaprobe ist kursiv und grau hinterlegt angegeben und kann verwendet werden, falls ein größeres Volumen beim Überstand zum Überpipettieren in den ELISA bevorzugt wird. Das eigentliche ELISA-Protokoll wird durch die alternative Vorgehensweise bei der Extraktion nicht beeinflusst.

1.	Jeweils 20 µl Standards und Kontrollen in die entsprechenden Wells der EXTRACT-PLATE 96 pipettieren. <i>Alternativ jeweils 25 µl Standards und Kontrollen pipettieren.</i>
2.	Jeweils 20 µl STANDARD A zu den für die Plasmaproben vorgesehenen Wells hinzugeben. <i>Alternativ jeweils 25 µl STANDARD A hinzugeben.</i>
3.	Jeweils 200 µl EQUA-REAG in die Wells mit Standards und Kontrollen hinzugeben. <i>Alternativ jeweils 250 µl EQUA-REAG hinzugeben.</i>
4.	Jeweils 200 µl Plasmaproben in die entsprechenden Wells pipettieren. <i>Alternativ jeweils 250 µl Plasmaproben pipettieren.</i>
5.	Platte für 2 h bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
6.	Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.

7.	250 µl ASSAY-BUFF in alle Wells pipettieren. 5 min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8.	Die Platte 3-mal gründlich mit 350 µl Reinigungspuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
9.	100 µl ELUTION-BUFF in alle Wells pipettieren. Alternativ 125 µl ELUTION-BUFF pipettieren. <i>Bitte beachten: Die Farbveränderung durch Hinzupipettieren des Eluierungspuffers kann zwischen Standards und Proben variieren.</i>
10.	Platte mit FOILS abdecken und für 15 min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) schütteln. FOILS entfernen. Überstand anschließend nicht verwerfen bzw. Platte nicht ausleeren! Von den Überständen wird für den nachfolgenden ELISA folgendes Volumen benötigt: Metanephryn 50 µl

6.3 Metanephryn ELISA

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

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Metanephryn
	15,1 – 3.600 pg/ml

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannten Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standardabsorptionen (Berechnung der mittleren Absorption, linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) mit einer Konzentration von 0,001 pg/ml für Standard A

(diese Ausrichtung ist aufgrund der logarithmischen Darstellung der Daten erforderlich) 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 und Kontrollen können direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (Standard F) gefunden werden, müssen entsprechend mit Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG** verdünnt und nochmals bestimmt werden.

Umrechnung:

Metanephrin [pg/ml] x 5,07 = Metanephrin [pmol/l]

7.1 Erwartete Referenzbereiche

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

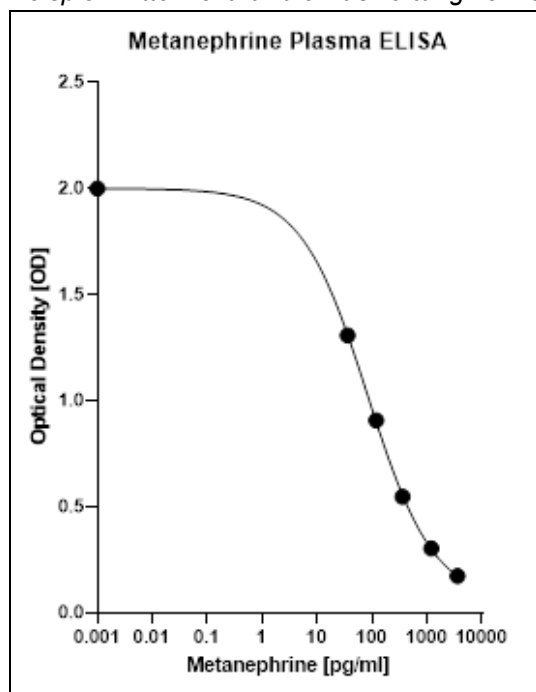
Die unten angegebenen erwarteten Referenzwerte basieren auf einer Methodenvergleichsstudie mit LC-MS/MS [2] mit Blutproben abgenommen in sitzender Position.

	Metanephrin
erwarteter Referenzbereich (ULN)	< 100 pg/ml
typischer pathologischer Bereich	bis zu 3.534 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 [15]. Ungefähr 20% der Tumore werden in diesem Graubereich gefunden, insbesondere beim Vorliegen eines hereditären Syndroms oder bei einem Inzidentalom sowie in sporadischen Fällen von Phäochromozytomen mit einem Durchmesser von weniger als 1 cm. Bei einem Befund im Graubereich wird die wiederholte Probennahme mit vorheriger Abklärung sonstiger Einflüsse wie z.B. Medikation und Alter der Patientin bzw. des Patienten empfohlen. Sollte die Probe weiterhin im grenzwertigen Bereich gefunden werden, kann ein Clonidin-Suppressionstest in Erwägung gezogen werden [16, 17].

7.2 Typische Standardkurve

⚠ *Beispiel: Bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



8. Kontrollproben

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen Vorschriften zu verwenden. Verwenden Sie Kontrollen im normalen und pathologischen Bereich. Kommerzielle Kontrollproben müssen dabei wie die unbekannten Proben behandelt werden. Kontrollproben sollten innerhalb der festgelegten Vertrauensbereiche liegen (siehe auch „Grenzen des Tests“ Kapitel 2.2). Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report angegeben.

9. Assaycharakteristika**9.1 Leistungsdaten**

Analytische Sensitivität	
	Metanephrin
Limit of Blank (LOB)	9,9 pg/ml
Limit of Detection (LOD)	14,9 pg/ml
Limit of Quantification (LOQ)	15,1 pg/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)	
Substanz	Kreuzreaktion [%]
	Metanephrin
Metanephrin	100
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
Tyramin	< 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

Lot-zu-Lot			
	Probe	Mittelwert ± SD [pg/ml]	CV [%]
Metanephrin (n = 6)	1	97,7 ± 16,5	16,9
	2	870 ± 117	13,5

Die Wiederfindung wurde bestimmt nach dem CLSI Standard EP 34 1st ed.

Wiederfindung			
	Bereich [pg/ml]	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Metanephrin	20,9 – 1.291	102	90 – 109

Linearität			
	Serielle Verd. bis	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Metanephrin	1:64	107	101 – 124

Methodenvergleich: ELISA vs. LC-MS/MS [13]

Metanephrin	$y = 0,91x + 1,8; r^2 = 0,96; n = 46$
-------------	---------------------------------------

Klinische Leistung [2]*

	Diagnostische Spezifität [%]	Diagnostische Sensitivität [%]	Positiver Prädiktiver Wert (PPV) [%]	Negativer Prädiktiver Wert (NPV) [%]
Metanephrin	96	45	79	84
	Positives Likelihood Ratio (LR+)		Negatives Likelihood Ratio (LR-)	
	11,25		0,57	

*Die Bestimmung von Metanephrin und Normetanephrin unter Verwendung des Nephries Plasma ELISA DEE8300 führt zu einer besseren klinischen Leistung (diagnostische Sensitivität 100% und diagnostische Spezifität 96%).

9.2 Metrologische Rückführbarkeit

Die den Standards und Kontrollen des Metanephrine Plasma ELISA zugewiesenen Werte sind durch Wägung mit qualitätskontrolliertem Analyten auf SI-Einheiten rückführbar.

Standards und Kontrollen

	Unsicherheit [%]
Metanephrin	2,7

Metanephrine Plasma ELISA

	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
Metanephrin	26,0

*Das Intervall der maximalen erweiterten Unsicherheit ist der Bereich, in dem der wahre Messwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% um den gemessenen Wert liegt.

10. Referenzen/Literatur

1. Lee, S.M., et al., *Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of plasma metanephrines for differential diagnosis of adrenal incidentaloma*. Ann Lab Med, 2015. **35**(5): p. 519-22.
2. Peaston, R.T., et al., *Performance of plasma free metanephrines measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of pheochromocytoma*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(7-8): p. 546-52.
3. de Jong, W.H., et al., *Dietary influences on plasma and urinary metanephrines: implications for diagnosis of catecholamine-producing tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(8): p. 2841-9.
4. Boot, C., et al., *Single-centre study of the diagnostic performance of plasma metanephrines with seated sampling for the diagnosis of pheochromocytoma/paraganglioma*. Ann Clin Biochem, 2017. **54**(1): p. 143-148.
5. Shen, Y., et al., *A simple and robust liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for determination of plasma free metanephrines and its application to routine clinical testing for diagnosis of pheochromocytoma*. Biomed Chromatogr, 2019. **33**(10): p. e4622.
6. Anas, S.S. and S.D. Vasikaran, *An audit of management of patients with borderline increased plasma-free metanephrines*. Ann Clin Biochem, 2010. **47**(Pt 6): p. 554-8.
7. Eisenhofer, G., et al., *Plasma metanephrines in renal failure*. Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 668-77.
8. Eisenhofer, G., et al., *Pheochromocytoma catecholamine phenotypes and prediction of tumor size and location by use of plasma free metanephrines*. Clin Chem, 2005. **51**(4): p. 735-44.
9. Eisenhofer, G., et al., *Biochemical Diagnosis of Chromaffin Cell Tumors in Patients at High and Low Risk of Disease: Plasma versus Urinary Free or Deconjugated O-Methylated Catecholamine Metabolites*. Clin Chem, 2018. **64**(11): p. 1646-1656.
10. Grouzmann, E., et al., *Diagnostic accuracy of free and total metanephrines in plasma and fractionated metanephrines in urine of patients with pheochromocytoma*. Eur J Endocrinol, 2010. **162**(5): p. 951-60.
11. Pussard, E., A. Chaouch, and T. Said, *Radioimmunoassay of free plasma metanephrines for the diagnosis of catecholamine-producing tumors*. Clin Chem Lab Med, 2014. **52**(3): p. 437-44.
12. Unger, N., et al., *The value of immunoassays for metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytomas*. Horm Metab Res, 2009. **41**(9): p. 676-9.

13. de Jong, W.H., et al., *Plasma free metanephrine measurement using automated online solid-phase extraction HPLC tandem mass spectrometry*. Clin Chem, 2007. **53**(9): p. 1684-93.
14. Mullins, F., et al., *Enzyme-linked immunoassay for plasma-free metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma in adults is not ideal*. Clin Chem Lab Med, 2011. **50**(1): p. 105-10.
15. Eisenhofer, G., et al., *Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true- from false-positive test results*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2656-66.
16. Remde, H., et al., *Improved Diagnostic Accuracy of Clonidine Suppression Testing Using an Age-Related Cutoff for Plasma Normetanephrine*. Hypertension, 2022. **79**(6): p. 1257-1264.
17. Bartsch, D.K. and K. Lorenz. *S2k-Leitlinie - Operative Therapie von Nebennierentumoren 2017*; Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/088-008I_S2k_Operative-Therapie_Nebennierentumoren_2019-07.pdf.

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

11. Änderungen

Version	Freigabedatum	Kapitel	Änderung
20.0	2022-03-25	Alle	- Die alternative Assay-Version, 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Antiserum inkubieren, wurde entfernt - Die IFU wurde gemäß der IVDR-Verordnung (EU) 2017/746 überarbeitet - Probenstabilität (Kapitel 5) hat sich geändert - Der erwartete Referenzbereich (ULN) hat sich geändert (Kapitel 7.1) - Typischer pathologischer Bereich wurde hinzugefügt (Kapitel 7.1) - LOB, Lot-to-Lot und klinische Leistung wurden in den Assaycharakteristika hinzugefügt (Kapitel 9.1) - Metrologische Rückführbarkeit wurde hinzugefügt (Kapitel 9.2) - Referenzen/Literatur wurde aktualisiert (Kapitel 10)
21.0	2023-09-18	2.1/9.2 4.1 7.1 9.1 10	- Redaktionelle Änderungen - Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert - Hinweis bezüglich Clonidin-Suppressionstest hinzugefügt - Wiederfindung aktualisiert - Referenzen überarbeitet
22.0	2024-12-19	4.1 7 9.2	- Gefahrenkennzeichnung BA E-0040 gemäß SDS aktualisiert - Anmerkung Verdünnungsfaktor bei Berechnung hinzugefügt - Metrologische Rückführbarkeit aktualisiert

Productos relacionados:

- Nefrinas Plasma ELISA
- Normetanefrina Plasma ELISA

1. Introducción**1.1 Uso previsto y principio del ensayo**

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de metanefrina libre en plasma. La determinación de metanefrina ayuda en la detección de paragangliomas y feocromocitomas. La metanefrina (metadrenalinae) se extrae primero utilizando una matriz de intercambio iónico seguida de un proceso de acilación. El ELISA competitivo posterior utiliza el formato de placa de microtitulación. El antígeno se une a la fase sólida de la placa de microtitulación. Los estándares, controles y muestras aciladas compiten con los analitos unidos a fase sólida por un número fijo de sitios de unión de anticuerpos. Después de que el sistema está en equilibrio, el antígeno libre y los complejos antígeno-anticuerpo libres se eliminan mediante lavado. El anticuerpo unido a la fase sólida se detecta mediante un conjugado de peroxidasa-IgG anti-conejo utilizando TMB como sustrato. Dando como resultado una reacción de color. La reacción se monitorea a una longitud de onda de 450 nm. La cuantificación de muestras desconocidas se logra comparando su absorbancia con una curva de referencia preparada con concentraciones estándar conocidas. Se recomienda el procesamiento manual del ELISA.

El uso de equipos automáticos es responsabilidad del usuario. Este diagnóstico in vitro es solo para uso profesional.

1.2 Aplicación clínica

La metanefrina y la normetanefrina son los metabolitos de las catecolaminas epinefrina y norepinefrina, respectivamente [1]. Se sabe que las células derivadas de tumores neuroendocrinos (por ejemplo, feocromocitoma y paraganglioma) producen catecolaminas, que se secretan episódicamente a través de vesículas en el torrente sanguíneo [2, 3]. Pero además de esto, una pequeña porción de las catecolaminas se metaboliza dentro de las células madre a los metabolitos correspondientes de catecolaminas – a saber, metanefrina, normetanefrina (y 3-metoxitiramina en el caso de la dopamina) – que se secretan a niveles bajos continuamente en el torrente sanguíneo [4, 5]. Estudios y publicaciones recientes han demostrado que la cuantificación de estas metanefrinas libres en plasma y normetanefrinas libres en plasma es el marcador bioquímico más preciso para el diagnóstico clínico de feocromocitoma y paraganglioma en pacientes [5-13]. El feocromocitoma y el paraganglioma son tumores neuroendocrinos raros y ocurren con una incidencia anual estimada de 1 a 8 casos por 1,000,000 [10, 14].

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse únicamente en los resultados de laboratorio, incluso si estos resultados se evalúan de acuerdo con los criterios de calidad del método. Cualquier resultado de laboratorio es sólo una parte del cuadro clínico total del paciente.

Sólo en los casos en que los resultados de laboratorio están en un acuerdo aceptable con el cuadro clínico general del paciente, se puede utilizar las consecuencias terapéuticas.

2. Precauciones, directrices, advertencias y limitaciones de procedimiento**2.1 Precauciones, directrices y advertencias de procedimiento**

- (1) Este kit está destinado exclusivamente a uso profesional. Los usuarios deben tener un conocimiento profundo de este protocolo para el uso exitoso de este kit. Sólo son válidas las instrucciones de ensayo suministradas con el kit y deben utilizarse para realizar el ensayo. Sólo se obtendrá un rendimiento fiable si se siguen estricta y cuidadosamente las instrucciones proporcionadas.
- (2) Este ensayo ha sido validado para un determinado tipo de muestra, tal como se indica en Uso previsto (consulte el Capítulo 1). Cualquier uso no indicado de este kit es responsabilidad del usuario y el fabricante no se hace responsable.
- (3) Deben seguirse los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).
- (4) Para reducir la exposición a sustancias potencialmente nocivas, utilice batas de laboratorio, guantes de protección desechables y gafas protectoras cuando sea necesario.
- (5) Si se producen incidentes graves relacionados con este producto, deben comunicarse al fabricante y a las autoridades nacionales competentes.
- (6) Todos los reactivos del kit y las muestras deben llevarse a temperatura ambiente y mezclarse suavemente pero a fondo antes de su uso. Para la dilución o reconstitución, utilice agua desionizada, destilada o ultrapura. Evite congelar y descongelar repetidamente los reactivos y las muestras.

- (7) La microplaca contiene tiras a presión. Los pocillos no utilizados deben almacenarse a 2 - 8° C en la bolsa de aluminio sellada con desecante y utilizarse en el marco suministrado. Las tiras de microtitulación que se retiren del marco para su uso deben marcarse como corresponde para evitar cualquier confusión.
- (8) Se recomienda encarecidamente determinar la muestra por duplicado.
- (9) Una vez iniciada la prueba, todos los pasos deben completarse sin interrupción. Asegúrese de que los reactivos, materiales y dispositivos necesarios estén preparados para su uso en el momento adecuado.
- (10) Los tiempos de incubación influyen en los resultados. Todos los pocillos deben manipularse en el mismo orden e intervalos de tiempo.
- (11) Para evitar la contaminación cruzada de reactivos, utilice puntas de pipeta desechables nuevas para dispensar cada reactivo, muestra, estándar y control.
- (12) Debe establecerse una curva estándar para cada serie.
- (13) Los controles deben incluirse en cada serie y estar dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza figuran en el informe de control de calidad suministrado con el kit.
- (14) No mezcle componentes del kit con números de lote diferentes dentro de una misma prueba y no utilice reactivos cuya fecha de caducidad supere la indicada en las etiquetas del kit.
- (15) Evite el contacto con solución de parada que contenga 0,25 M H₂ SO₄. Puede causar irritación de la piel y quemaduras. En caso de contacto con los ojos o la piel, aclarar inmediatamente con agua.
- (16) El sustrato TMB tiene un efecto irritante sobre la piel y las mucosas. En caso de posible contacto, lavar los ojos con abundante volumen de agua y la piel con jabón y abundante agua. Enjuagar los artículos contaminados antes de reutilizarlos.
- (17) Para obtener información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit, consulte la ficha de datos de seguridad (FDS). La ficha de datos de seguridad de este producto está disponible directamente en el sitio web del fabricante o previa solicitud.
- (18) Los reactivos del kit deben considerarse residuos peligrosos y eliminarse de acuerdo con la normativa nacional.
- (19) Los valores de referencia esperados que se indican en estas instrucciones de ensayo son sólo indicativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.
- (20) En caso de que el kit de ensayo o sus componentes presenten daños graves, deberá informarse al fabricante por escrito, a más tardar una semana después de recibir el kit. Los componentes individuales gravemente dañados no deben utilizarse para una prueba. Deben almacenarse adecuadamente hasta que el fabricante decida qué hacer con ellos. Si se decide que ya no son adecuados para las mediciones, deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional.
- (21) Los resultados obtenidos con este kit de pruebas no deben tomarse como la única razón de cualquier consecuencia terapéutica, sino que han de correlacionarse con otras pruebas diagnósticas y observaciones clínicas.
- (22) Los reactivos de este kit que contienen suero o plasma humano han sido analizados y confirmados negativos para VIH I/II, HBsAg y VHC mediante procedimientos aprobados. No obstante, todos los reactivos deben tratarse como riesgos biológicos potenciales durante su uso y eliminación.

2.2 Limitaciones

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificación de esta prueba podría influir en los resultados. La metanefrina sintética disponible comercialmente es siempre una mezcla de la forma D y L. Esto tiene implicaciones importantes si se utiliza metanefrina sintética para enriquecer muestras nativas. El anticuerpo utilizado en este kit tiene una tasa de reconocimiento específica de las formas D y L. Póngase en contacto con el fabricante para obtener más detalles en caso de que se utilizó metanefrina sintética para enriquecer muestras nativas.

2.2.1 Sustancias que interfieren y manipulación adecuada de las muestras

Las muestras que contienen precipitados o hebras de fibrina pueden causar resultados inexactos. Las muestras hemolíticas (hasta 0,5 mg/ml de hemoglobina), las muestras ictericas (hasta 0,5 mg/ml de bilirrubina) y las muestras lipémicas (hasta 17 mg/ml de triglicéridos) no influyen en los resultados del ensayo. Si no pueden estimarse las concentraciones y existen dudas sobre si se cumplen los valores límite mencionados para las muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas, las muestras no deben utilizarse en el ensayo.

2.2.2 Interferencia con medicamentos y alimentos

Los medicamentos como los agentes hipertensivos antihipertensivos, antidepresivos, antipsicóticos, simpaticomiméticos y L-DOPA pueden influir en los niveles plasmáticos de metanefrinas. Las bebidas con cafeína, la nicotina y los medicamentos para mejorar el estado de ánimo también pueden afectar los niveles plasmáticos de metanefrinas. Además, el estrés y la tensión física debe evitarse poco antes del muestreo.

2.2.3 Efecto de gancho de dosis alta

No se observó ningún efecto de gancho en esta prueba.

3. Almacenamiento y estabilidad

Guarde el kit y los reactivos a 2 – 8 °C hasta la fecha de vencimiento. No utilizar el kit ni los componentes más allá de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del kit. Una vez abiertos, los reactivos son estables durante 2 meses cuando se almacenan a 2 – 8 °C. Una vez abierta la bolsa resellable de la placa ELISA, tener cuidado para nuevamente cerrarla herméticamente, incluyendo el desecante.

4. Materiales

4.1 Contenido del kit

BA D-0090	FOILS	Láminas adhesivas - lista para usar
Contenido:	Láminas adhesivas en bolsa resellable	
Volumen:	1 x 4 láminas	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Tampón de lavado concentrado - concentrado 50x
Contenido:	Tampón con detergente no iónico y pH fisiológico	
Volumen:	1 x 20 ml/vial, tapón morado	
BA E-0040	CONJUGATE	Conjugado enzimático - listo para usar
Contenido:	Inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas con peroxidasa	
Volumen:	1 x 12 ml/vial, tapón rojo	
Descripción:	La especie es la cabra	
Identificación de peligros:	 GHS07	
Palabra clave:	Advertencia	
Ingredientes peligrosos:	2-metil-2H-isotiazol-3-ona	
Declaraciones de peligro:	H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel..	
Consejos de precaución:	P280 Utilizar guantes de protección. P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua. P333+P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Acudir a un médico. P501 Eliminar el contenido/recipiente en un punto de recogida de residuos autorizado.	
BA E-0055	SUBSTRATE	Sustrato - listo para usar
Contenido:	Sustrato cromogénico que contiene 3,3',5,5'- tetrametilbencidina, tampón de sustrato y peróxido de hidrógeno	
Volumen:	1 x 12 ml/vial, tapón negro	
BA E-0080	STOP-SOLN	Solución de paro - lista para usar
Contenido:	Ácido sulfúrico 0,25 M	
Volumen:	1 x 12 ml/vial, tapón gris	

BA E-0131	U ADR MN	Tiras de microtitulación de Metanefrina - listas para usar
Contenido:	1 placa de micropocillos de 96 pocillos (12x8) precubierta de antígeno en una bolsa azul resellable con desecante	
BA E-8110	MN-AS	Antisuero de Metanefrina - listo para usar
Contenido:	Anticuerpo de conejo antimetanefrina en tampón con proteínas y conservante sin mercurio, de color azul	
Volumen:	1 x 6 ml/vial, tapón azul	
Descripción:	La especie del anticuerpo es conejo, la especie de la proteína en el tampón es bovina	
BA E-8327	ADJUST-BUFF	Tampón de ajuste - listo para usar
Contenido:	TRIS-Buffer	
Volumen:	1 x 10 ml/vial, tapón amarillo	
BA R-8312	ACYL-CONC	Concentrado de Acilación - concentrado
Contenido:	Reactivo de acilación en DMSO	
Volumen:	1 x 1,5 ml/vial, tapón blanco	
Identificación de peligros:	  GHS05 GHS08	
Palabra clave:	Peligro	
Ingredientes peligrosos:	Anhídrido succínico	
Declaraciones de peligro:	H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H334 Puede provocar síntomas de alergia, asma o dificultades respiratorias si se inhala.	
Consejos de precaución:	P260 No respirar la niebla/vapores/aerosol. P280 Llevar guantes/ropa protectora/protección ocular. P303+P361+P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el cabello): Quitar inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuagar a piel con agua. P304+P340 EN CASO DE INHALACIÓN: Llevar a la persona al aire libre y mantenerla cómoda para respirar. P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P501 Eliminar el contenido/recipiente en un punto de recolección de residuos autorizado.	
Declaraciones EUH:	EUH071 Corrosivo para las vías respiratorias.	
BA R-8313	ASSAY-BUFF	Tampón de ensayo - listo para usar
Contenido:	25% disolvente orgánico	
Volumen:	1 x 30 ml/vial, tapón naranja	
Identificación de peligros:	 GHS02	
Palabra clave:	Advertencia	
BA R-8318	EXTRAC-PLATE 96	Placa de extracción - lista para usar
Contenido:	1 placa de 96 pocillos, precubierta con intercambiador de iones en bolsa resellable	

BA R-8325	CLEAN-CONC 25X	Concentrado de limpieza - concentrado 25x
Contenido:	Tampón con acetato de sodio	
Volumen:	1 x 20 ml/vial, tapón marrón	
Identificación de peligros:	 GHS05	
Palabra clave:	Peligro	
Declaraciones de peligro:	H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.	
Consejos de precaución:	P280 Llevar guantes/ropa protectora/protección ocular. P303+P361+P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el cabello): Quitar inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuagar a piel con agua. P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar los lentes de contacto, si están presentes y es fácil removerlos. Continúe enjuagando. P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P501 Eliminar el contenido/recipiente en un punto de recolección de residuos autorizado.	
BA R-8326	ELUTION-BUFF	Tampón de elución - listo para usar
Contenido:	Hidróxido sódico 0,1 M, color púrpura oscuro	
Volumen:	1 x 14 ml/vial, tapón verde	
BA R-8828	EQUA-REAG	Reactivo ecualizante - listo para usar
Contenido:	Suero humano, negativo para VIH I/II, HBsAg y VHC	
Volumen:	1 x 14 ml/vial, tapón blanco	
Descripción:	La especie es humana	

4.2 Estándares y controles

Normas y controles: listos para usar

Nº de cat.	Componente	Color Gorra	Concentración [pg/ml] MN	Concentración [pmol/l] MN	Volumen/ Vial
BA E-8301	STANDARD A	blanco	0	0	4 ml
BA E-8302	STANDARD B	amarillo	36	183	4 ml
BA E-8303	STANDARD C	naranja	120	608	4 ml
BA E-8304	STANDARD D	azul	360	1825	4 ml
BA E-8305	STANDARD E	gris	1200	6084	4 ml
BA E-8306	STANDARD F	negro	3600	18252	4 ml
BA E-8351	CONTROL 1	verde	Consulte el informe de control de calidad para conocer el valor esperado y el intervalo aceptable.		4 ml
BA E-8352	CONTROL 2	rojo			4 ml

Conversión: metanefrina [pg/ml] x 5,07 = metanefrina [pmol/l].

Contenido: Tampón ácido con estabilizador sin mercurio, enriquecido con una cantidad definida de metanefrina.

4.3 Materiales adicionales requeridos pero no proporcionados en el kit

- Material absorbente (toalla de papel)
- Agua (desionizada, destilada o ultrapura)

4.4 Equipo adicional requerido pero no proporcionado en el kit

- Pipetas de precisión calibradas para dispensar volúmenes entre 20 y 350 µl; 3 ml
- Dispositivo de lavado de placas de microtitulación (manual, semiautomático o automatizado)
- Lector ELISA capaz de leer la absorbancia a 450 nm y, si es posible, a 620 - 650 nm.
- Agitador de placas de microtitulación (amplitud de agitación 3 mm; aprox. 600 rpm)
- Mezclador vórtex

5. Recolección, manipulación y almacenamiento de muestras**Plasma con EDTA o heparina**

La sangre total debe recogerse en tubos de centrifuga (Monovette o Vacuette) que contengan EDTA o heparina como anticoagulante y centrifugarse (según las instrucciones del fabricante) inmediatamente después de la recogida. En caso de duda, se recomienda no utilizar en el ensayo muestras hemolíticas, ictericas y lipémicas (véase 2.2.1).

Conservación: hasta 3 días a 2 - 8 °C, durante más tiempo (hasta 6 meses) a -20 °C.

Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas.

6. Procedimiento de ensayo

Deje que todos los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente y mézclelos bien por inversión suave antes de utilizarlos. Numere la placa de extracción y las placas de micropocillos (las tiras de micropocillos que se retiren del bastidor para su uso deben marcarse en consecuencia para evitar cualquier confusión). Se recomienda realizar determinaciones por duplicado.

La unión de los antisueros y del conjugado enzimático y la actividad de la enzima dependen de la temperatura. Cuanto mayor sea la temperatura, mayores serán los valores de absorción. La variación de los tiempos de incubación tendrá influencias similares en la absorbancia. La temperatura óptima durante el inmunoensayo enzimático es entre 20 y 25 °C.

Si el producto se prepara por partes, los pocillos no utilizados de las Placas de Extracción deben taparse para evitar la contaminación. Tras la preparación, los pocillos usados deben etiquetarse para evitar el doble uso.

Durante la incubación nocturna a 2 - 8 °C con el antisuero, la temperatura debe ser uniforme en toda la placa ELISA para evitar cualquier desviación y efecto de borde.

⚠ *Es obligatorio el uso de un agitador de placas de microtitulación con las siguientes especificaciones: amplitud de agitación 3 mm; aprox. 600 rpm. La agitación con ajustes diferentes podría influir en los resultados.*

6.1 Preparación de reactivos y notas adicionales**Tampón de lavado**

Diluir el tampón de lavado concentrado de 20 ml **WASH-CONC** **50X** con agua hasta un volumen final de 1000 ml. Conservación: 2 meses a 2 - 8 °C

Tampón de limpieza

Diluir el concentrado de limpieza de 20 ml **CLEAN-CONC** **25X** con agua hasta un volumen final de 500 ml. Conservación: 2 meses a 2 - 8 °C

Solución de acilación

⚠ Como la solución de acilación solo es estable durante un **máximo de 3 minutos**, no debe prepararse antes de comenzar el ensayo. Por consiguiente, su preparación se describe en el protocolo en el capítulo 6.3, paso 3. ¡Desechar después de usarlo!

Tiras de microtitulación de metanefrina

En raras ocasiones pueden verse residuos del reactivo bloqueante y estabilizante en los pocillos en forma de pequeños puntos o líneas blancas. Estos residuos no influyen en la calidad del producto.

Placa de extracción

En raras ocasiones pueden verse residuos del intercambiador de cationes en los pocillos en forma de pequeños puntos o líneas negras. Estos residuos no influyen en la calidad del producto.

6.2 Preparación de muestras – Extracción

El siguiente procedimiento de extracción puede realizarse con 200 µl o 250 µl de muestra de plasma. El procedimiento para 250 µl de plasma está resaltado en gris y en cursiva y puede utilizarse en caso de que se prefieran mayores volúmenes de sobrenadante para pipetear al ELISA posterior. El procedimiento ELISA en sí no se ve afectado por este protocolo alternativo.

1.	Pipetear 20 µl de estándares y controles en los pocillos respectivos de la EXTRACT-PLATE 96 . <i>Alternativamente, pipetear 25 µl de estándares y controles.</i>
2.	Añadir 20 µl de STANDARD A a todos los pocillos destinados a las muestras de plasma . <i>Alternativamente, añada 25 µl de STANDARD A.</i>
3.	Añada 200 µl de EQUA-REAG a los pocillos con estándares y controles . <i>Como alternativa, añada 250 µl de EQUA-REAG.</i>
4.	Pipetear 200 µl de muestras de plasma en los pocillos respectivos. <i>Alternativamente, pipetear 250 µl de muestras de plasma.</i>
5.	Incubar la placa durante 2 h a RT (20 - 25 °C) en un agitador (aprox. 600 rpm).
6.	Vacíe la placa y séquela dando golpecitos con la placa invertida sobre material absorbente.
7.	Pipetear 250 µl de ASSAY-BUFF en todos los pocillos. Incubar la placa durante 5 minutos a RT (20 - 25 °C) en un agitador (aprox. 600 rpm). Vaciar la placa y secar dando golpecitos con la placa invertida sobre material absorbente.
8.	Lavar la placa 3 veces añadiendo 350 µl de tampón de limpieza , desechar el contenido y secar cada vez golpeando la placa invertida sobre material absorbente.
9.	Pipetear 100 µl de ELUTION-BUFF en todos los pocillos. <i>Alternativamente, pipetear 125 µl de ELUTION-BUFF.</i> <i>Atención: Los cambios de color provocados por el tampón de elución pueden variar entre los estándares y las muestras.</i>
10.	Cubrir la placa con FOILS . Incubar 15 min a RT (20 - 25 °C) en un agitador (aprox. 600 rpm).  Retire el FOILS . No decantar después el sobrenadante. El siguiente volumen del sobrenadante es necesario para el ELISA posterior: Metanefrina 50 µl

6.3 Metanefrina ELISA

1.	Pipetear 25 µl de ADJUST-BUFF en todos los pocillos de las tiras de microtitulación de metanefrina . W ADR MN .
2.	Pipetear 50 µl de los estándares, controles y muestras extraídos en los pocillos respectivos. <i>Sujete la placa de extracción ligeramente inclinada para facilitar este paso del pipeteado.</i>
3.	Preparación de la solución de acilación : Pipetear 80 µl de ACYL-CONC en 3 ml de agua y mezclar bien.
4.	Pipetear 25 µl de la solución de acilación recién preparada en todos los pocillos.
5.	Incubar durante 15 min a RT (20 - 25 °C) en un agitador (aprox. 600 rpm).
6.	Pipetear 50 µl del Antisuero Metanefrina MN-AS en todos los pocillos.
7.	Cubrir la placa con FOILS , agitar durante 1 min a RT (20 - 25 °C) en un agitador e incubar durante 15 - 20 h (toda la noche) a 2 - 8 °C sin agitar.

8.	Retirar la lámina. Desechar o aspirar el contenido de los pocillos. Lavar la placa 4 veces añadiendo 300 µl de tampón de lavado, desechar el contenido y secar cada vez dando golpecitos con la placa invertida sobre material absorbente.
9.	Pipetear 100 µl del CONJUGATE en todos los pocillos.
10.	Incubar durante 30 min a RT (20 - 25 °C) en un agitador (aprox. 600 rpm).
11.	Desechar o aspirar el contenido de los pocillos. Lavar la placa 4 veces añadiendo 300 µl de tampón de lavado, desechar el contenido y secar cada vez dando golpecitos con la placa invertida sobre material absorbente.
12.	Pipetear 100 µl del SUBSTRATE en todos los pocillos e incubar durante 20 - 30 min a RT (20 - 25 °C) en un agitador (aprox. 600 rpm). Evitar la exposición directa a la luz solar.
13.	Añadir 100 µl de STOP-SOLN a todos los pocillos y agitar brevemente la placa de microtitulación.
14.	Leer la absorbancia de la solución en los pocillos al cabo de 10 minutos, utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm (si se dispone de él, se recomienda una longitud de onda de referencia entre 620 nm y 650 nm).

7. Cálculo de resultados

Rango de medición	Metanefrina
	15.1 – 3600 pg/ml

La curva estándar se obtiene trazando las lecturas de absorbancia (calcular la absorbancia media) de los estándares (lineal, eje y) frente a las concentraciones estándar correspondientes (logarítmica, eje x) utilizando una concentración de 0,001 pg/ml para el estándar A (esta alineación es obligatoria debido a la presentación logarítmica de los datos).

Utilizar la regresión no lineal para el ajuste de curvas (por ejemplo, 4 parámetros, marquardt).

⚠ *Este ensayo es un ensayo competitivo. Esto significa que los valores de DO disminuyen con el aumento de la concentración del analito. Los valores DO encontrados por debajo de la curva estándar corresponden a altas concentraciones del analito en la muestra y deben ser reportados como positivos.* Las concentraciones de las **muestras y los controles** pueden leerse directamente a partir de la curva estándar.

Las muestras con concentraciones superiores a la norma más alta (norma F) deben diluirse con el reactivo de igualación **EQUA-REAG** incluido y volver a analizarse. Para el cálculo de las concentraciones, se debe tener en cuenta este factor de dilución.

Conversión:

metanefrina [pg/ml] x 5,07 = metanefrina [pmol/l].

7.1 Valor de referencia

Se recomienda reiteradamente que cada laboratorio determine sus propios valores de referencia.

Los valores de referencia esperados indicados a continuación se basan en estudios de comparación de métodos con LC-MS/MS [2] con muestras de sangre tomadas en posición sentada.

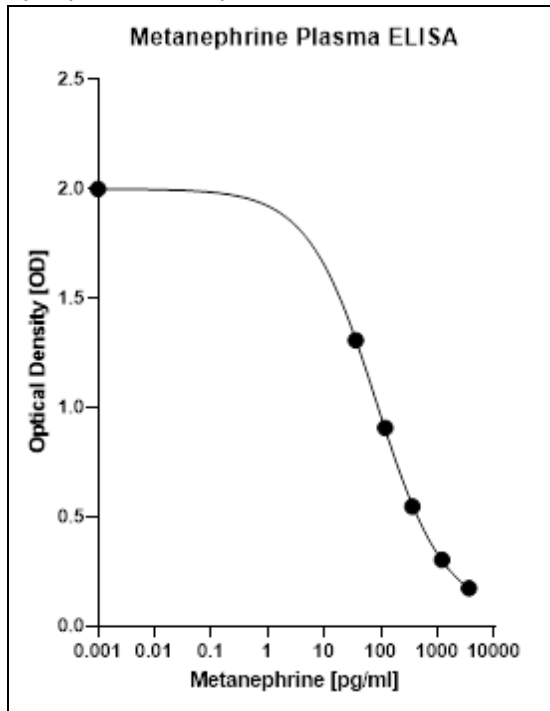
	Metanefrina
valor de referencia esperado (ULN)	< 100 pg/ml
rango patológico típico	hasta 3534 pg/ml

Para la interpretación de los resultados hay que tener en cuenta una zona gris. Esta zona gris no depende de la metodología utilizada y se refleja en un aumento de leve a mediano de metanefrina y normetanefrina de hasta 4 veces el límite superior [15]. Aproximadamente el 20% de los tumores se encuentran en esta zona gris, especialmente en el caso del síndrome hereditario, tumores incidentales y en casos esporádicos de feocromocitomas con un diámetro inferior a 1 cm.

En caso de un resultado en la zona gris, se recomienda recoger una nueva muestra junto con una anamnesis relativa especialmente a influencias como la medicación y la edad del paciente. Si la muestra continúa encontrándose en el área gris, se puede considerar una prueba de supresión con clonidina [16, 17].

7.2 Curva estándar típica

⚠ Ejemplo: No usar para el cálculo!!



8. Muestras de control

Los límites de confianza de los controles del kit se indican en el informe de control de calidad.

Se recomienda utilizar muestras de control de acuerdo con las regulaciones nacionales. Utilice controles tanto a nivel normal como patológico. Las muestras de control obtenidas comercialmente deben tratarse como muestras desconocidas. Las muestras de control deben estar dentro de los límites de confianza establecidos (consultar el capítulo 2.2 "Limitaciones"). Los límites de confianza de los controles del kit se indican en el Reporte de Control de Calidad.

9. Características del ensayo

9.1 Datos de rendimiento

Sensibilidad analítica	
	Metanefrina
Límite de espacios en blanco (LOB)	9.9 pg/ml
Límite de detección (LOD)	14.9 pg/ml
Límite de cuantificación (LOQ)	15.1 pg/ml

Especificación analítica (reactividad cruzada)	
Sustancia	Reactividad cruzada [%]
	Metanefrina
Metanefrina	100
Normetanefrina	0.05
3-Metoxitiramina	< 0.01
Adrenalina	< 0.01
Noradrenalina	< 0.01
Dopamina	< 0.01
Ácido mandélico vanílico	< 0.01
Ácido homovanílico	< 0.01
L-DOPA	< 0.01
L-tirosina	< 0.01
Tiramina	< 0.01
Paracetamol	< 0.01

Precisión							
Intraensayo				Entre ensayos			
	Muestra	Media [pg/ml]	CV [%]		Muestra	Media [pg/ml]	CV [%]
Metanefrina	1	66.3	11.4	Metanefrina	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

Lote a lote			
	Muestra	Media ± DE [pg/ml]	CV [%]
Metanefrina (n=6)	1	97.7 ± 16.5	16.9
	2	870 ± 117	13.5

La recuperación se determinó según la norma CLSI EP 34 1ra edición.

Recuperación			
	Rango [pg/ml]	Media [%]	Rango [%]
Metanefrina	20.9 - 1291	102	90 - 109

Linealidad			
	Dilución en serie hasta	Media [%]	Rango [%]
Metanefrina	1:64	107	101 - 124

Comparación de métodos: ELISA frente a LC-MS/MS [13]	
Metanefrina	$y = 0.91x + 1.8$; $r^2 = 0.96$; $n = 46$

Rendimiento del diagnóstico [2]*				
	Diagnóstico Especificidad [%]	Diagnóstico Sensibilidad [%]	Valor predictivo positivo (VPP) [%]	Valor predictivo negativo (VPN) [%]
Metanefrina	96	45	79	84
	Razón de verosimilitud positiva (LR+)		Razón de verosimilitud negativa (LR-)	
	11.25		0.57	

*La determinación tanto de metanefrina como de normetanefrina, utilizando el ELISA DEE8300 para plasma de nefrina, da lugar a un mejor rendimiento diagnóstico (sensibilidad diagnóstica del 100% y especificidad diagnóstica del 96%).

9.2 Trazabilidad metrológica

Los valores asignados a los estándares y controles del ELISA Metanefrina Plasma son trazables a Unidades SI mediante pesada con analito de calidad controlada.

Normas y controles	
	Incertidumbre [%]
Metanefrina	2.7

Metanefrina Plasma ELISA	
	Incertidumbre expandida [%] k = 2*
Metanefrina	26.0

*Define un intervalo sobre el resultado medido que incluirá el valor verdadero con una probabilidad del 95%.

10. Referencias/Literatura

1. Lee, S.M., et al., Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of plasma metanephrines for differential diagnosis of adrenal incidentaloma. *Ann Lab Med*, 2015. 35(5): p. 519-22.
2. Peaston, R.T., et al., Performance of plasma free metanephrines measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of pheochromocytoma. *Clin Chim Acta*, 2010. 411(7-8): p. 546-52.
3. de Jong, W.H., et al., Dietary influences on plasma and urinary metanephrines: implications for diagnosis of catecholamine-producing tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. 94(8): p. 2841-9.
4. Boot, C., et al., Single-centre study of the diagnostic performance of plasma metanephrines with seated sampling for the diagnosis of pheochromocytoma/paraganglioma. *Ann Clin Biochem*, 2017. 54(1): p. 143-148.
5. Shen, Y., et al., A simple and robust liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for determination of plasma free metanephrines and its application to routine clinical testing for diagnosis of pheochromocytoma. *Biomed Chromatogr*, 2019. 33(10): p. e4622.
6. Anas, S.S. and S.D. Vasikaran, An audit of management of patients with borderline increased plasma-free metanephrines. *Ann Clin Biochem*, 2010. 47(Pt 6): p. 554-8.
7. Eisenhofer, G., et al., Plasma metanephrines in renal failure. *Kidney Int*, 2005. 67(2): p. 668-77.
8. Eisenhofer, G., et al., Pheochromocytoma catecholamine phenotypes and prediction of tumor size and location by use of plasma free metanephrines. *Clin Chem*, 2005. 51(4): p. 735-44.
9. Eisenhofer, G., et al., Biochemical Diagnosis of Chromaffin Cell Tumors in Patients at High and Low Risk of Disease: Plasma versus Urinary Free or Deconjugated O-Methylated Catecholamine Metabolites. *Clin Chem*, 2018. 64(11): p. 1646-1656.
10. Grouzmann, E., et al., Diagnostic accuracy of free and total metanephrines in plasma and fractionated metanephrines in urine of patients with pheochromocytoma. *Eur J Endocrinol*, 2010. 162(5): p. 951-60.
11. Pussard, E., A. Chaouch, and T. Said, Radioimmunoassay of free plasma metanephrines for the diagnosis of catecholamine-producing tumors. *Clin Chem Lab Med*, 2014. 52(3): p. 437-44.
12. Unger, N., et al., The value of immunoassays for metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytomas. *Horm Metab Res*, 2009. 41(9): p. 676-9.
13. de Jong, W.H., et al., Plasma free metanephrine measurement using automated online solid-phase extraction HPLC tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 2007. 53(9): p. 1684-93.

14. Mullins, F., et al., Enzyme-linked immunoassay for plasma-free metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma in adults is not ideal. Clin Chem Lab Med, 2011. 50(1): p. 105-10.
15. Eisenhofer, G., et al., Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true- from false-positive test results. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(6): p. 2656-66.
16. Remde, H., et al., Improved Diagnostic Accuracy of Clonidine Suppression Testing Using an Age-Related Cutoff for Plasma Normetanephrine. Hypertension, 2022. 79(6): p. 1257-1264.
17. Bartsch, D.K. and K. Lorenz. S2k-Leitlinie - Operative Therapie von Nebennierentumoren 2017; Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/088-008l_S2k_Operative-Therapie_Nebennierentumoren_2019-07.pdf.

Para obtener documentación actualizada o cualquier otra información, póngase en contacto con su proveedor local.

11. Cambios

Versión	Fecha de lanzamiento	Capítulo	Cambia
20.0	2022-03-25	Todos	- La versión alternativa, 2 h a RT de incubación con antisuero, se eliminó - La IFU se revisó de acuerdo con la normativa IVDR (UE) 2017/746 - Cambios en la estabilidad de las muestras (capítulo 5) - Cambio del valor de referencia esperado (ULN) (capítulo 7.1) - Se ha añadido la gama patológica típica (capítulo 7.1) - LOB, Lote a Lote y rendimiento diagnóstico se agregaron a las características del ensayo (capítulo 9.1) - Se ha añadido la trazabilidad metrológica (capítulo 9.2) - Referencias/Literatura actualizada (capítulo 10)
21.0	2023-09-18	2.1/9.2 4.1 7.1 9.1 10	- Cambios editoriales - Etiquetado de peligros actualizado según la Hoja de Datos de Seguridad - Se agregó un apartado sobre la prueba de supresión de clonidina. - Recuperación actualizada - Referencias actualizadas
22.0	2024-12-19	4.1 7 9.2	- Etiquetado de peligro BA E-0040 actualizado según la ficha de datos de seguridad (FDS) - Nota añadida al factor de dilución en el cálculo - Trazabilidad metrológica actualizada

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta