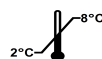


**Instructions for use**

**Normetanephrine Plasma RIA** **Fast Track**

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

**REF****BA R-8200****IVD****200 kBq**

## 1. Introduction

### 1.1 Intended use and principle of the test

<sup>125</sup>I – Radioimmunoassay for the quantitative determination of free Normetanephrine in plasma.

#### **Related Products:**

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

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

Normetanephrine (Normetadrenaline) is first extracted using an ion exchange matrix followed by an acylation process.

The assay procedure follows the basic principle of radioimmunoassay, involving competition between a radioactive and a non-radioactive antigen for a fixed number of antibody binding sites. The amount of <sup>125</sup>I-labelled antigen bound to the antibody is inversely proportional to the analyte concentration of the sample. When the system is in equilibrium, the antibody bound radioactivity is precipitated with a second antibody in the presence of polyethylene glycol. The precipitate is counted in a gamma counter. Quantification of unknown samples is achieved by comparing their activity with a reference curve prepared with known standards.

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

### 1.2 Clinical application

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

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

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

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

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

## 2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations

### 2.1 Precautions, guidelines and warnings

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

- (6) All kit reagents - with the exception of Precipitating Reagent – and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) For dilution or reconstitution purposes use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (8) The radioactive material (<sup>125</sup>Iodine, half life 60 days, emitting ionizing X-radiation with 28 keV and G-radiation with 35.5 keV) may be received, acquired, possessed and used only by physicians, laboratories or hospitals. Products are dispatched on the basis of the nuclear and radiation regulations.
- (9) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (10) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.
- (11) Incubation times do influence the results. All tubes should be handled in the same order and time intervals.
- (12) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (13) A standard curve must be established for each run.
- (14) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report.
- (15) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (16) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (17) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (18) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence (e.g. medication before a scheduled surgery) but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
- (19) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed according to national regulations.

## 2.2 Limitations

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

### 2.2.1 Interfering substances

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

### 2.2.2 Drug interferences

Please refer to point "Sample collection and storage".

### 2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

## 3. Storage and stability

Store the unopened reagents at 2 - 8 °C until expiration date. Do not use components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened, the reagents are stable for 1 month when stored at 2 - 8 °C.


## 4. Materials

### 4.1 Content of the kit

<b>BA D-0090</b>	<b>FOILS</b>	<b>Adhesive Foil</b> - Ready to use
Contents:	Adhesive Foils in a resealable pouch	
Volume:	1 x 4 foils	
<b>BA R-0030</b>	<b>PREC-REAG</b>	<b>Precipitating Reagent</b> - Ready to use
Content:	Goat anti-rabbit serum in PEG phosphate buffer	
Volume:	1 x 55 ml/vial, yellow cap	
<b>BA R-8210</b>	<b>AS NMN</b>	<b>Normetanephrine Antiserum</b> - Ready to use
Content:	Rabbit anti-normetanephrine antibody, yellow coloured	
Volume:	1 x 5.25 ml/vial, yellow cap	

**BA R-0220** <sup>125</sup>I NAD NMN <sup>125</sup>I – Normetanephine - Ready to useContent: <sup>125</sup>I labeled Normetanephine, red coloured

Volume: 1 x 5.5 ml/vial, yellow cap


Hazards identification: 

Radioactive, activity &lt; 200 kBq

**BA R-8312** ACYL-CONC **Acylation Concentrate** – Concentrated

Content: Acylation reagent in DMSO

Volume: 1 x 1.5 ml/vial, dark grey cap

Hazards identification: 

H302 Harmful if swallowed.

**Standards and Controls** - Ready to use

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

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

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

**BA R-8313** ASSAY-BUFF **Assay Buffer** - Ready to use

Content: 25 % organic solvent

Volume: 1 x 30 ml/vial, orange cap

**BA R-8318** EXTRACT-PLATE 96 **Extraction Plate** - Ready to use

Content: 1 x 96 well (6x16) plate, precoated with ion-exchanger in a resealable pouch

**BA R-8325** CLEAN-CONC 25x **Cleaning Concentrate** - Concentrated 25x

Content: Buffer with sodium acetate

Volume: 1 x 20 ml/vial, brown cap

**BA R-8326** ELUTION-BUFF **Elution Buffer** - Ready to use

Content: 0.1 M Sodium hydroxide, dark purple coloured

Volume: 1 x 14 ml/vial, dark green cap

**BA R-8327** ADJUST-BUFF **Adjustment Buffer** - Ready to use

Content: TRIS buffer with BSA and a non-mercury stabilizer

Volume: 1 x 6 ml/vial, light purple cap

**BA R-8828** EQUA-REAG **Equalizing-Reagent** – Ready to use

Content: Human serum, negative for HIV I/II, HBsAg and HCV

Volume: 1 x 14 ml/vial, white cap

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

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 20 - 500 µl; 3 ml
  - Conical tubes and suitable rack
  - Centrifuge capable of at least 3 000 x g
  - Suitable device for aspirating or decanting the tubes
  - Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
  - Gamma Counter
  - Vortex mixer
  - Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- For the washing steps during the extraction a microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated) may be applied.

#### 5. Sample collection and storage

Medications like Serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors, tricyclic antidepressants, MAO inhibitors, antihypertensive drugs and L-DOPA can influence Metanephrine and Normetanephrine level. People who are taking such medication should consult with their doctor before specimen collection. Sympathomimetic agents, sport and smoking can also influence Metanephrine and Normetanephrine level. Alcohol and caffeinated drinks should be avoided the day before and including the day of sample collection.

##### **EDTA- or Heparin-Plasma**

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

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

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

Repeated freezing and thawing should be avoided.

#### 6. Test procedure

Allow all reagents – with the exception of Precipitating Reagent - to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the extraction wells / RIA tubes accordingly. Duplicates are recommended.

 *Pipetted liquids should not adhere to the wall of the RIA tubes. If necessary please centrifuge the tubes for 1 minute at 500 x g to spin down adhering liquids.*

##### 6.1 Preparation of reagents

###### **Cleaning Buffer**

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

Storage: 1 month 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 4.

Discard after use!


## 6.2 Preparation of samples

### Extraction

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

## 6.3 Normetanephrine RIA

 **The use of conical tubes for the RIA is highly recommended!**

1.	Pipette <b>20 µl</b> of <b>Elution Buffer</b> into the <b>tubes</b> for the <b>NSB</b> .
2.	Pipette <b>20 µl</b> of the <b>extracted standards, controls</b> and <b>samples</b> into the respective tubes.
3.	Pipette <b>25 µl</b> of <b>Adjustment Buffer</b> into <b>all tubes (except totals)</b> .
4.	Preparation of <b>Acylation Solution</b> : Pipette <b>80 µl Acylation Reagent Concentrate</b> (BA R-8312) to <b>3 ml water</b> (deionized, distilled, or ultra-pure) and mix thoroughly.
5.	Pipette <b>25 µl</b> of the freshly prepared <b>Acylation Solution</b> into <b>all tubes (except totals)</b> .
6.	Mix thoroughly (vortex) and incubate for <b>15 min</b> at <b>RT</b> (20 - 25 °C).
7.	Pipette <b>50 µl</b> of <b>Normetanephrine Antiserum</b> into <b>all tubes (except totals and NSB)</b> ; mix thoroughly (vortex).
8.	Incubate for <b>1 h</b> at <b>RT</b> (20 - 25 °C).
9.	Pipette <b>50 µl</b> of the <b><sup>125</sup>I Normetanephrine</b> into <b>all tubes</b> and mix thoroughly (vortex).
10.	Cover tubes. Incubate for <b>15 - 20 h</b> (overnight) at <b>2 - 8 °C</b> .
11.	Mix the chilled (2 - 8 °C) <b>Precipitating Reagent</b> thoroughly, pipette each <b>500 µl</b> into <b>all tubes (except totals)</b> , and mix on a vortex.
12.	Incubate for <b>15 min</b> at <b>2 - 8 °C</b> .
13.	Centrifuge for <b>15 min</b> at <b>3 000 x g</b> , if possible in a refrigerated centrifuge.  <b>Continue without any delay with step 14.</b>
14.	<b>Decant</b> or aspirate the <b>supernatant carefully (except totals)</b> . Blot the tubes dry and leave them upside down for 2 minutes.
15.	<b>Count</b> all tubes for <b>1 min</b> in a gamma counter.

**7. Calculation of results**

<b>Measuring range</b>	<b>Normetanephrine</b>
	24.1 – 7 200 pg/ml

Subtract the mean cpm of the non-specific binding NSB from the mean cpm of standards, controls and samples.

The standard curve, from which the concentrations in the samples can be taken, is obtained by using the percentage of (B-NSB)/(B<sub>0</sub>-NSB) measured for the standards (linear, y-axis) against the corresponding concentrations (logarithmic, x-axis).

Use non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).

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

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

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

**Conversion**

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

**Expected reference value**

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

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

<b>Normetanephrine</b>
< 196 pg/ml

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

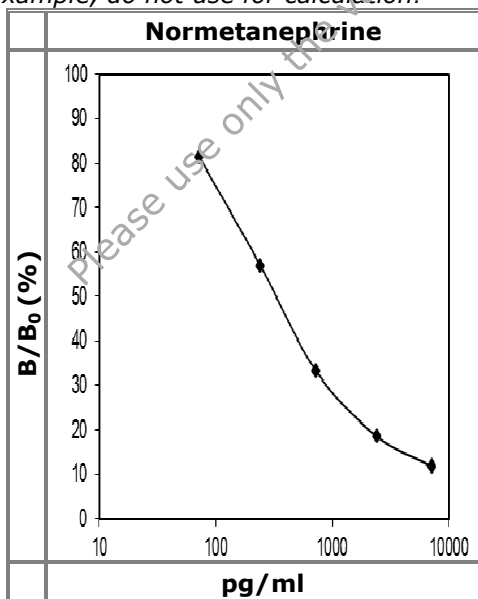
In case of a result in the grey area, it is recommended to collect a new sample together with an anamnesis concerning especially influences like the medication and age of the patient.

**7.1 Quality control**

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

**7.2 Typical standard curve**

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



## 8. Assay characteristics

Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	Normetanephrine	
	LOD (pg/ml)	21.4
	LOQ (pg/ml)	24.1

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)
	Derivatized Metanephrine	1.3
	Derivatized Normetanephrine	100
	3-Methoxytyramine	7.7*
	Adrenaline	< 0.01
	Noradrenaline	< 0.01
	Dopamine	< 0.01
	Vanillic mandelic acid	< 0.01
	Homovanillic acid	< 0.01
	L-DOPA	< 0.01
	L-Tyrosin	< 0.01
	Tyramine	< 0.01

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

Precision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Sample	Mean (pg/ml)	CV (%)		Sample	Mean (pg/ml)	CV (%)
Normetanephrine	1	148	8.4	Normetanephrine	1	144	12.0
	2	293	5.3		2	271	9.5
	3	870	5.3		3	839	8.4
	4	2 197	7.6		4	2 124	8.3

Linearity		Serial dilution up to	Mean (%)	Range (%)
	Normetanephrine		1:64	109

Recovery		Mean (%)	Range (%)
	Normetanephrine		110

Method Comparison RIA vs. LC-MS/MS <sup>(1)</sup>	Substance	Equation	r <sup>2</sup> = 0.98; n = 49
	Normetanephrine	y = 0.93x + 8.4	









## 9. References/Literature

- (1) De Jong et al. Plasma free metanephrine measurement using automated online solid phase extraction HPLC-Tandem mass spectrometry. Clin Chem, 53(9): 1684-1693 (2007)
- (2) Eisenhofer et al. Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. Clin Chem, 60:1486-1499 (2014)
- (3) Eisenhofer et al. Plasma metadrenalines: Do they provide useful information about sympatho-adrenal function and catecholamine metabolism? Clin Sci (Lond),88:533-542 (1995)
- (4) Berkel et al. Diagnosis of endocrine disease: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma. Eur J Endocrinol, 170: R109-R119
- (5) Manz et al. Development of enantioselective immunoassays for free plasma metanephrines. Ann.N.Y.Acad.Sci., 1018:582-587 (2004)
- (6) De Jong et al. Dietary Influences on Plasma and Urinary Metanephrines: Implications for Diagnosis of Catecholamine-Producing Tumors. J Clin Endocrinol Metab, 94(8):2841-2849 (2009)
- (7) Deutschbein et al. Influences of Various Confounding Variable and Storage Conditions on Metanephrine and Normetanephrine Levels in Plasma. Clin Endocrinol, 72(2):153-160 (2010)
- (8) Eisenhofer et al. Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma: How to Distinguish True- from False-Positive Test Results. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 88(6):2656-2666 (2003)

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

### Symbols:

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

## 1. Einleitung

### 1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

<sup>125</sup>I – Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von freiem Normetanephrin in Plasma.

#### Artverwandte Produkte:

2-MET Plasma ELISA <sup>Fast Track</sup>	2-MET Plasma RIA <sup>Fast Track</sup>
Metanephriene Plasma ELISA <sup>Fast Track</sup>	Metanephriene Plasma RIA <sup>Fast Track</sup>
Normetanephriene Plasma ELISA <sup>Fast Track</sup>	

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

Normetanephrin (Normetadrenalin) wird mittels eines Ionenaustauscher-Gels extrahiert und danach acyliert. Die Durchführung des RIA-Tests folgt den Grundprinzipien eines Radioimmunoassays. Radioaktiv markiertes Antigen und nicht markiertes Antigen binden kompetitiv an eine definierte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Nach Gleichgewichtseinstellung werden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem zweiten Antikörper in Anwesenheit von PEG gefällt. Das Präzipitat wird nach zentrifugieren und dekantieren oder absaugen des Überstands in einem Gamma-Counter gemessen. Die Menge an radioaktiv gebundenem Antigen ist indirekt proportional zur Antigenkonzentration der Probe. Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve und Abgleich der gemessenen Aktivitäten ermittelt.

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

### 1.2 Klinische Anwendung

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

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

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

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

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

## 2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

### 2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

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

- (6) Alle Reagenzien des Kits, mit Ausnahme des **PREC-REAG**, sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra pures Wasser verwenden.
- (8) Das radioaktive Material (<sup>125</sup>Iod, Halbwertszeit 60 Tage, gibt eine ionisierende Röntgenstrahlung mit 28 keV und eine Gammastrahlung mit 35,5 keV ab) darf nur von Ärzten, Laboren oder Krankenhäusern in Empfang genommen, erworben, besessen und verwendet werden. Der Vertrieb des Produkts erfolgt unter Beachtung der strahlenschutzrechtlichen Bestimmungen.
- (9) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (10) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (11) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Röhrchen sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (12) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (13) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (14) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (15) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (16) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe die Sicherheitsdatenblätter (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (17) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (18) Jegliche therapeutische Maßnahme (z.B. die Verabreichung von Medikamenten vor einer planmäßigen Operation) darf sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern muss im Zusammenhang mit anderen diagnostischen Untersuchungen und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.
- (19) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

## 2.2 Grenzen des Tests

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

### 2.2.1 Interferenzen

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

### 2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bitte Punkt 5 "Probenmaterial und Lagerung" beachten!

### 2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

## 3. Lagerung und Haltbarkeit

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufzubewahren. Die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 1 Monat stabil, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden.

## 4. Materialien

### 4.1 Reagenzien im Kit

**BA D-0090**    **FOILS**                    **Adhesive Foil** - Gebrauchsfertig  
 Inhalt:            4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel  
 Volumen:        1 x 4 Folien

**BA R-0030** **PREC-REAG** **Precipitating Reagent** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Ziege anti-Kaninchen Serum in PEG Phosphatpuffer

Volumen: 1 x 55 ml/ Fläschchen, Deckel gelb

**BA R-8210** **AS NMN** **Normetanephine Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Anti-Normetanephren Kaninchen Antikörper, gelb gefärbt

Volumen: 1 x 5,25 ml/Fläschchen, Deckel gelb

**BA R-0220** **<sup>125</sup>I NAD NMN** **<sup>125</sup>I – Normetanephine** - GebrauchsfertigInhalt: <sup>125</sup>I markiertes Normetanephine, rot gefärbt

Volumen: 1 x 5,5 ml/ Fläschchen, Deckel gelb

Mögliche Gefahren:



Radioaktiv, Aktivität &lt; 200 kBq

**BA R-8312** **ACYL-CONC** **Acylation Concentrate** – Konzentriert

Inhalt: Acylierungsreagenz in DMSO

Volumen: 1 x 1,5 ml/ Fläschchen, Deckel dunkelgrau

Mögliche Gefahren:



H302 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

**Standards** und **Controls** - Gebrauchsfertig

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

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

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

**BA R-8313** **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 25 % organisches Lösungsmittel

Volumen: 1 x 30 ml/ Fläschchen, Deckel orange

**BA R-8318** **EXTRACT-PLATE 96** **Extraction Plate** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 1 x 96 Well (6x16) Platte, beschichtet mit Ionenaustauscher in einem wiederverschließbaren Beutel

**BA R-8325** **CLEAN-CONC 25x** **Cleaning Concentrate** - Konzentriert 25x

Inhalt: Natriumacetat Puffer

Volumen: 1 x 20 ml/ Fläschchen, Deckel braun

**BA R-8326** **ELUTION-BUFF** **Elution Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 0,1 M Natriumhydroxid, dunkellila gefärbt

Volumen: 1 x 14 ml/ Fläschchen, Deckel dunkelgrün

**BA R-8327** **ADJUST-BUFF** **Adjustment Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: TRIS Puffer mit BSA und quecksilberfreien Stabilisatoren

Volumen: 1 x 6 ml/ Fläschchen, Deckel lila

**BA R-8828** **EQUA-REAG** **Equalizing-Reagent** – Gebrauchsfertig

Inhalt: Humanes Serum, negativ auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet

Volumen: 1 x 14 ml/Fläschchen, Deckel weiß

#### 4.2 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 20 – 500 µl; 3 ml
- RIA-Spitzbodenröhrchen mit passendem Ständer
- Zentrifuge (möglichst mit Kühlung), mind. 3000 x g
- Absaug- oder Dekantiervorrichtung
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Vortex-Mischer
- Gamma Counter
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)

Für die Waschschritte während der Extraktion kann ein Waschgerät (manuell, halb-automatisch, automatisch) verwendet werden.

#### 5. Probenmaterial und Lagerung

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

##### EDTA- oder Heparin-Plasma

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


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

Hämolytische und lipämische Plasmen sollten nicht eingesetzt werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden.

#### 6. Testdurchführung

Alle Reagenzien und Proben, mit Ausnahme des **PREC-REAG**, müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Das Beschriften der Extraktionswells und der RIA Röhrchen ist erforderlich. Es empfiehlt sich, Doppelbestimmungen anzusetzen.

 *Es ist erforderlich, die Röhrchen 1 Min bei 500xg zu zentrifugiert, falls sich nach den jeweiligen Pipettierschritten Flüssigkeitsreste am Röhrchenrand befinden sollten.*

##### 6.1 Vorbereitung der Reagenzien

###### Cleaning Puffer

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

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 °C

###### Acylierungslösung

Da die gebrauchsfertige Acylierungslösung maximal 3 Minuten stabil ist, darf diese erst unmittelbar vor Gebrauch angesetzt werden. Deshalb wird die Vorbereitung im Protokoll unter Kapitel 6.3, Punkt 4 beschrieben.


Nach Gebrauch verwerfen!

## 6.2 Probenvorbereitung Extraktion

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

## 6.3 Normetanephrin RIA

 Für den RIA sollten **Spitzbodenröhrchen** verwendet werden!

1.	<b>20 µl ELUTION-BUFF</b> in die <b>Röhrchen</b> für die <b>NSB</b> pipettieren.
2.	<b>20 µl</b> der extrahierten <b>Standards, Kontrollen</b> und <b>Proben</b> in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
3.	<b>25 µl ADJUST-BUFF</b> in <b>alle Röhrchen (außer Totalaktivität T)</b> pipettieren.
4.	Vorbereitung der <b>Acylierungslösung:</b> <b>80 µl ACYL-COND</b> (BA R-8312) zu <b>3 ml Wasser</b> (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) pipettieren und sorgfältig mischen.
5.	Jeweils <b>25 µl</b> frisch hergestellte <b>Acylierungslösung</b> in <b>alle Röhrchen (außer Totalaktivität T)</b> pipettieren.
6.	Röhrchen sorgfältig mischen (Vortex) und <b>15 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) inkubieren.
7.	<b>50 µl AS NMN</b> in <b>alle Röhrchen (außer Totalaktivität T und NSB)</b> pipettieren und sorgfältig mischen (Vortex).
8.	<b>1 Stunde</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) inkubieren.
9.	<b>50 µl <sup>125</sup>I NAD NMN</b> in <b>alle Röhrchen</b> pipettieren und sorgfältig mischen (Vortex).
10.	Röhrchen abdecken und <b>15 - 20 Stunden</b> (über Nacht) bei <b>2 – 8 °C</b> inkubieren.
11.	Das vorgekühlte (2 - 8 °C) <b>PREC-REAG</b> gründlich aufschütteln und jeweils <b>500 µl</b> in <b>alle Röhrchen (außer Totalaktivität T)</b> pipettieren und sorgfältig mischen (Vortex).
12.	<b>15 Min</b> bei <b>2 - 8 °C</b> inkubieren.
13.	<b>15 Min</b> bei <b>3000 x g</b> , möglichst mit Kühlung, <b>zentrifugieren</b> .  <b>Umgehend mit Schritt 14 fortfahren!</b>
14.	<b>Überstand</b> absaugen oder <b>vorsichtig dekantieren (außer Totalaktivität T)</b> . Röhrchen ausklopfen und für 2 Minuten umgedreht stehen lassen.
15.	Röhrchen <b>1 Minute</b> in einem Gamma Counter <b>messen</b> .


## 7. Berechnung der Ergebnisse

<b>Messbereich</b>	<b>Normetanephrin</b>
	24,1 – 7200 pg/ml

Der Mittelwert der cpm der Nicht-Spezifischen-Bindung NSB wird von den Mittelwerten der Standards, Kontrollen und Proben abgezogen.

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannt Proben ermittelt werden kann, wird nach Auftragen der  $(B-NSB)/(B_0-NSB)$  für die Standards im linearen Maßstab auf der y-Achse gegen die entsprechende Konzentration im logarithmischen Maßstab auf der x-Achse, erstellt.

Zur Kurvenberechnung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) verwendet.

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

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

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

### Umrechnung

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

### Erwarteter Referenzwert

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

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


<b>Normetanephrin</b>
< 196 pg/ml

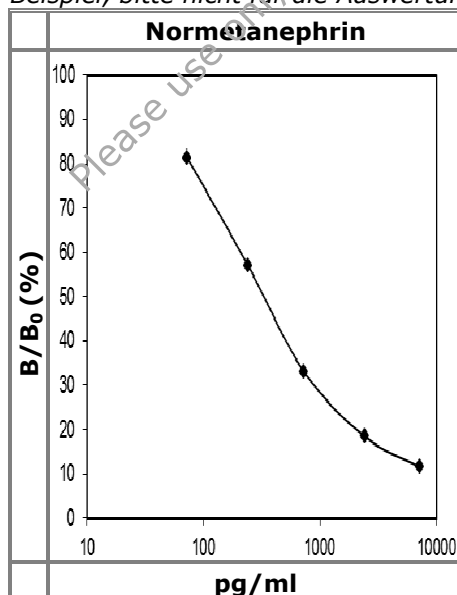
Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist ein methodenunabhängiger Graubereich bei Metanephrin und Normetanephrin zu beachten. Dieser entspricht einer leichten bis moderaten Erhöhung bis zum 4-fachen des oberen Grenzwertes (Eisenhofer et al. 2003). In diesem Graubereich liegen ca. 20 % der Tumore, vor allem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

### 7.1 Qualitätskontrolle

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

### 7.2 Typische Standardkurve

 *Beispiel, bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



## 8. Testcharakteristika

<b>Analytische Sensitivität</b>		<b>Normetanephrin</b>
	LOD (pg/ml)	21,4
	LOQ (pg/ml)	24,1

<b>Analytische Spezifität (Kreuzreaktion)</b>	<b>Substanz</b>	<b>Kreuzreaktion (%)</b>
		Normetanephrin
	Derivatisiertes Metanephrin	1,3
	Derivatisiertes Normetanephrin	100
	3-Methoxytyramin	7,7*
	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	

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

<b>Präzision</b>							
<b>Intra-Assay</b>				<b>Inter-Assay</b>			
	Probe	Mittelwert (pg/ml)	CV (%)		Probe	Mittelwert (pg/ml)	CV (%)
Normetanephrin	1	148	8,4	Normetanephrin	1	144	12,0
	2	293	5,3		2	271	9,5
	3	870	5,3		3	839	8,4
	4	2197	7,6		4	2124	8,3

<b>Linearität</b>		Serielle Verdünnung bis	Mittelwert (%)	Bereich (%)
	Normetanephrin	1:64	109	106 - 119

<b>Wiederfindung</b>		Mittelwert (%)	Bereich (%)
	Normetanephrin	110	97 - 119

<b>Methodenvergleich zur LC-MS/MS<sup>(1)</sup></b>	Normetanephrin	$y = 0,93x + 8,4$	$r^2 = 0,98; n = 49$
---	----------------	-------------------	----------------------









**9. Referenzen/Literatur**

- (1) De Jong et al. Plasma free metanephrine measurement using automated online solid phase extraction HPLC-Tandem mass spectrometry. Clin Chem, 53(9): 1684-1693 (2007)
- (2) Eisenhofer et al. Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. Clin Chem, 60:1486-1499 (2014)
- (3) Eisenhofer et al. Plasma metadrenalines: Do they provide useful information about sympatho-adrenal function and catecholamine metabolism? Clin Sci (Lond),88:533-542 (1995)
- (4) Berkel et al. Diagnosis of endocrine disease: Biochemical diagnosis of phaeochromocytoma and paraganglioma. Eur J Endocrinol, 170: R109-R119
- (5) Manz et al. Development of enantioselective immunoassays for free plasma metanephrines. Ann.N.Y.Acad.Sci., 1018:582-587 (2004)
- (6) De Jong et al. Dietary Influences on Plasma and Urinary Metanephrines: Implications for Diagnosis of Catecholamine-Producing Tumors. J Clin Endocrinol Metab, 94(8):2841-2849 (2009)
- (7) Deutschbein et al. Influences of Various Confounding Variable and Storage Conditions on Metanephrine and Normetanephrine Levels in Plasma. Clin Endocrinol, 72(2):153-160 (2010)
- (8) Eisenhofer et al. Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma: How to Distinguish True- from False-Positive Test Results. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 88(6):2656-2666 (2003)

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

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

**Symbole:**

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