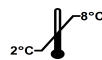


Instructions for use
2-MET Urine RIA **Fast Track**

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

REF**BA R-8600****IVD****400 kBq**

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

¹²⁵I – Radioimmunoassay for the quantitative determination of metanephrine and normetanephrine in urine.

First, metanephrine (metadrenaline) and normetanephrine (normetadrenaline) are quantitatively acylated.

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 ¹²⁵I-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 standard curve prepared with known standards.

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

1.2 Clinical application

Metanephrine and normetanephrine are the metabolites of the catecholamines epinephrine and norepinephrine, respectively. They are metabolized to vanillylmandelic acid or excreted with the urine. Patients with pheochromocytoma or other tumors derived from neuroendocrine cells show elevated urinary levels of total metanephrines.

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

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

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

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

2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations**2.1 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) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) All kit reagents - 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.
- (6) For the dilution or reconstitution purposes use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (7) The radioactive material (¹²⁵Iodine, 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. In compliance with regulations, a copy of the customer's current radioisotope license must be on file with the supplier. Orders cannot be shipped until the license is received by the supplier (Radiation Protection Act of June 30, 1989).
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (9) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.
- (10) Incubation times do influence the results. All tubes should be handled in the same order and time intervals.
- (11) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (12) A standard curve must be established for each run.

- (13) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report.
- (14) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (15) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets (MSDS). The Material Safety Data Sheet for this product is available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (16) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (17) 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.
- (18) 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

24-hour urine

Please note the sample preparation! If the percentage of the final concentration of acid is too high, the buffer capacity of the Acylation Buffer is insufficient. As a consequence metanephrine and normetanephrine will not be acylated quantitatively.

2.2.2 Drug interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of (nor-)metanephrine level in the sample.

2.2.3 High-Dose-Hook effect


No hook effect was observed in this test.


3. Storage and stability

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


4. Materials

4.1 Content of the kit

| | | |
|-------------------------|---|--|
| BA D-0023 | REAC-TUBES | Reaction Tubes - Ready to use |
| Content: | Reaction Tubes in a resealable pouch | |
| Volume: | 2 x 50 tubes | |
| BA R-0012 | ACYL-CONC | Acylation Concentrate - Concentrated |
| Content: | Concentrated acylation reagent | |
| Volume: | 1 x 0.5 ml/vial | |
| Hazards identification: |  | H 314 Causes severe skin burns and eye damage. |
| BA R-0075 | ACYL-DILUENT | Acylation Diluent - Ready to use |
| Content: | Dimethylsulfoxide | |
| Volume: | 1 x 4 ml/vial, dark grey cap | |
| BA R-0025 | PREC-REAG | Precipitating Reagent - Ready to use |
| Content: | Goat anti-rabbit serum in PEG phosphate buffer | |
| Volume: | 2 x 55 ml/vial, white cap | |
| BA R-8619 | HCL | Hydrochloric Acid - Ready to use |
| Content: | 0.25 M hydrochloric acid, yellow coloured | |
| Volume: | 1 x 30 ml/vial, dark green cap | |

BA R-0120 ¹²⁵I ADR MN **¹²⁵I – Metanephrine** - Ready to use
 Content: ¹²⁵I labeled Metanephrine, red coloured
 Volume: 1 x 5.5 ml/vial, blue cap
 Hazards identification: 

Radioactive, activity < 200 kBq

BA R-0220 ¹²⁵I NAD NMN **¹²⁵I – Normetanephrine** - Ready to use
 Content: ¹²⁵I labeled Normetanephrine, red coloured
 Volume: 1 x 5.5 ml/vial, yellow cap
 Hazards identification: 

Radioactive, activity < 200 kBq

BA R-8410 AS MN **Metanephrine Antiserum** - Ready to use
 Content: Rabbit anti-metanephrine antibody, blue coloured
 Volume: 1 x 5.25 ml/vial, blue cap

BA R-8510 AS NMN **Normetanephrine Antiserum** - Ready to use
 Content: Rabbit anti-normetanephrine antibody, yellow coloured
 Volume: 1 x 5.25 ml/vial, yellow cap

Standards and Controls - Ready to use

| Cat. no. | Component | Colour/Cap | Concentration ng/ml | | Concentration nmol/l | | Volume/Vial |
|------------------|------------|--------------|---|-------|----------------------|--------|-------------|
| | | | MN | NMN | MN | NMN | |
| BA R-8601 | STANDARD A | white | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 ml |
| BA R-8602 | STANDARD B | light yellow | 20 | 30 | 101 | 164 | 4 ml |
| BA R-8603 | STANDARD C | orange | 60 | 90 | 304 | 491 | 4 ml |
| BA R-8604 | STANDARD D | dark blue | 200 | 300 | 1 014 | 1 638 | 4 ml |
| BA R-8605 | STANDARD E | light grey | 600 | 900 | 3 042 | 4 914 | 4 ml |
| BA R-8606 | STANDARD F | black | 2 000 | 3 000 | 10 140 | 16 380 | 4 ml |
| BA R-8651 | CONTROL 1 | light green | Refer to QC-Report for expected value and acceptable range! | | | | 4 ml |
| BA R-8652 | CONTROL 2 | dark red | | | | | 4 ml |

Conversion: Metanephrine (ng/ml) x 5.07 = Metanephrine (nmol/l)
 Normetanephrine (ng/ml) x 5.46 = Normetanephrine (nmol/l)

Content: Acidic buffer with non-mercury preservatives, spiked with defined quantity of metanephrine and normetanephrine

BA R-8611 ACYL-BUFF **Acylation Buffer** - Ready to use
 Content: TRIS buffer
 Volume: 1 x 30 ml/vial, white cap

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

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 - 3000 µl
- Polystyrene tubes and suitable rack
- Centrifuge capable of at least 3 000 x g
- Temperature controlled water bath (37°C, 90°C) or similar heating device
- Suitable device for aspirating or decanting the tubes
- Gamma counter
- Vortex mixer
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)

5. **Sample collection and storage**

Spontaneous or 24-hour urine, collected in a bottle containing 10 - 15 ml of 6 M HCl, should be used. Determine the total volume of urine excreted during 24 h for calculation of the results!

Storage: for longer period (up to 6 months) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing of the samples should be avoided.

Avoid exposure to direct sunlight.

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 assay 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**

Acylation Solution



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

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

| | | | | |
|------------------------------|-------------|------------|------------|------------|
| Acylation Concentrate | 10 μ l | 20 μ l | 25 μ l | 50 μ l |
| Acylation-Diluent | 600 μ l | 1.2 ml | 1.5 ml | 3 ml |



The Acylation Solution has to be prepared freshly prior to the assay (not longer than 60 minutes in advance). Discard after use!

6.2 **Preparation and acylation**

Hydrolysis

1. Pipette **25 μ l** of **standards, controls** and **urine samples** into the respective **Reaction Tubes**.
2. Add **250 μ l Hydrochloric Acid** to **all tubes**.
3. Mix thoroughly (vortex) and hydrolyze for **30 min** at **90 °C**.
4. Let the **tubes** cool down to room temperature.



For the measurement of the free metanephrine and free normetanephrine only, leave away steps 3 and 4.

Acylation

1. Pipette **250 μ l** of **Acylation Buffer** into **all tubes**.
2. Add **25 μ l** of **Acylation Solution** (refer to 6.1) to **all tubes**.
3. Mix thoroughly (vortex) and acylate for **15 min** at **RT** (20 - 25 °C).
4. Add **1 ml water** (deionized, distilled, or ultra-pure) to **all tubes**.



The following volumes of the eluates are needed for the subsequent RIA:

Metanephrine 25 μ l

Normetanephrine 25 μ l

6.3 **Metanephrine RIA**

1. Pipette **25 μ l** of the **acylated Standard A** into polystyrene **tubes** for the **NSB**.
2. Pipette **25 μ l** of the **acylated standards, controls** and **samples** into the respective **tubes**.
3. Pipette **50 μ l** of the ¹²⁵I **Metanephrine** into **all tubes**.
4. Pipette **50 μ l** of **Metanephrine Antiserum** into **all tubes (except totals and NSB)**; mix thoroughly.
5. Cover **tubes**. Incubate for **60 min** at **37 °C**.
6. Mix the chilled (2 - 8 °C) **Precipitating Reagent** thoroughly, pipette each **500 μ l** into **all tubes (except totals)**, and mix on a vortex.
7. Incubate for **15 min** at **2 - 8 °C**.
8. Centrifuge for **15 min** at **3 000 x g**, if possible in a refrigerated centrifuge.
9. **Decant** or aspirate the **supernatant carefully (except totals)**. Blot the tubes dry and leave them upside down for 2 minutes.
10. **Count** all tubes for **1 min** in a gamma counter.

6.4 Normetanephrine RIA

| | |
|-----|---|
| 1. | Pipette 25 µl of the acylated Standard A into the polysterene tubes for the NSB . |
| 2. | Pipette 25 µl of the acylated standards, controls and samples into the respective tubes . |
| 3. | Pipette 50 µl of the ¹²⁵I Normetanephrine into all tubes . |
| 4. | Pipette 50 µl of Normetanephrine Antiserum into all tubes (except totals and NSB) ; mix thoroughly. |
| 5. | Cover tubes . Incubate for 60 min at 37 °C . |
| 6. | Mix the chilled (2 - 8 °C) Precipitating Reagent thoroughly, pipette each 500 µl into all tubes (except totals) , and mix on a vortex. |
| 7. | Incubate for 15 min at 2 - 8 °C . |
| 8. | Centrifuge for 15 min at 3 000 x g , if possible in a refrigerated centrifuge. |
| 9. | Decant or aspirate the supernatant carefully (except totals) . Blot the tubes dry and leave them upside down for 2 minutes. |
| 10. | Count all tubes for 1 min in a gamma counter. |

7. Calculation of results

| Measuring range | Metanephrine | Normetanephrine |
|-----------------|-----------------|------------------|
| | 8 – 2 000 ng/ml | 22 – 3 000 ng/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 read off, is obtained by plotting the percentage of (B-NSB)/ (B₀-NSB) measured for the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis).

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



This assay is a competitive assay. This means: the 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.

The total amount of Metanephrine and Normetanephrine excreted per day (µg/day) is calculated according to:

concentration read from the standard curve (in µg/l) x volume of urine excreted per day (in l/day)

Example

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

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

Conversion

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

Normetanephrine (ng/ml) x 5.46 = Normetanephrine (nmol/l)

Expected reference values


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

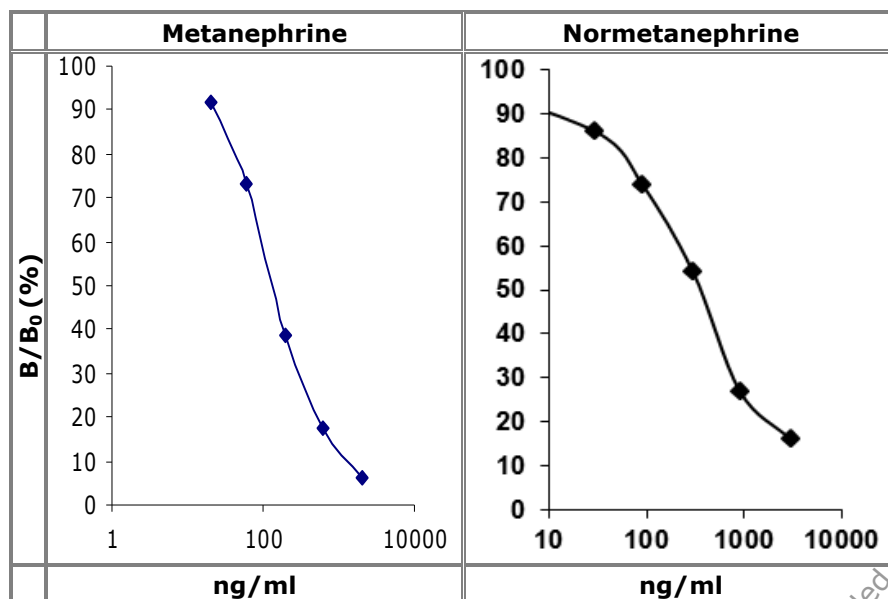
| | Metanephrine | Normetanephrine |
|---------------|--------------|-----------------|
| 24-hour urine | < 350 µg/day | < 600 µg/day |

7.1 Quality control

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

7.2 Typical standard curves

 Examples, do not use for calculation!



8. Assay characteristics

| Analytical Sensitivity (Limit of Detection) | Metanephrine | Normetanephrine |
|--|--------------|-----------------|
| | 8 ng/ml | 22 ng/ml |

| Analytical Specificity (Cross Reactivity) | Substance | Cross Reactivity (%) | |
|--|---|----------------------|-----------------|
| | | Metanephrine | Normetanephrine |
| | Derivatized Metanephrine | 100 | 0.06 |
| | Derivatized Normetanephrine | 0.33 | 100 |
| | Derivatized 3-methoxytyramine | < 0.02 | 0.08 |
| | Adrenaline | 0.03 | < 0.01 |
| | Noradrenaline | < 0.02 | 1.07 |
| | Dopamine | < 0.02 | 0.01 |
| | Vanillic mandelic acid, Homovanillic acid, L-Dopa, L-Tyrosin, Tyramin | < 0.02 | < 0.01 |

| Precision | | | | | | | |
|-----------------|--------|---------------|--------|-----------------|--------|---------------|--------|
| Intra-Assay | | | | Inter-Assay | | | |
| | Sample | Range (ng/ml) | CV (%) | | Sample | Range (ng/ml) | CV (%) |
| Metanephrine | 1 | 56 ± 5.9 | 10.6 | Metanephrine | 1 | 43.6 ± 3.6 | 6.2 |
| | 2 | 304 ± 23 | 7.6 | | 2 | 279 ± 26 | 9.3 |
| Normetanephrine | 1 | 230 ± 36 | 15.8 | Normetanephrine | 1 | 372 ± 78 | 20.8 |
| | 2 | 1 095 ± 73 | 6.6 | | 2 | 1142 ± 179 | 15.7 |

| Linearity | | Range (ng/ml) | Serial dilution up to | Mean (%) |
|-----------|-----------------|---------------|-----------------------|----------|
| | Metanephrine | 42 - 803 | 1:16 | 109 |
| | Normetanephrine | 105 - 2 528 | 1:16 | 90 |

| Recovery | | Sample | Range (%) | Mean (%) |
|-----------------|--------------|----------|-----------|----------|
| | Metanephrine | 1 | 73 - 121 | 94 |
| | | 2 | 85 - 122 | 103 |
| Normetanephrine | 1 | 86 - 111 | 100 | |

| | | | |
|---|-----------------|-----------------------|------------------|
| Method comparison versus HPLC* | Metanephrine | HPLC = 1.02 RIA - 0.3 | r = 0.99; n = 21 |
| | Normetanephrine | HPLC = 1.1 RIA - 0.3 | r = 0.99; n = 21 |
| *The concentrations were assessed using both the RIA and the HPLC method (external QC samples from UK NEQAS). The correlation between RIA and HPLC is excellent. Please take in mind, that the UK control values are the mean of about 40 different HPLC users, and contain always one pathological sample per sending. | | | |







9. References/Literature

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

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

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

Symbols:

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

1. Einleitung


1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

¹²⁵I – Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Metanephrin und Normetanephrin in Urin.

Während der Probenvorbereitung werden Normetanephrin und Metanephrin zu ihren entsprechenden N-Acyl-Derivaten azyliert.

Die Durchführung des RIA-Tests folgt den Grundprinzipien des Radioimmunoassays. Radioaktiv markiertes Antigen und nicht markiertes Antigen binden kompetitiv an eine definierte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Anschließend 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.

 *Der anti-Metanephrin Antikörper, welcher in diesem Testkit verwendet wird, erkennt lediglich die biologisch relevante L-Form des Metanephrins. Kommerziell erhältliches synthetisches Metanephrin ist jedoch immer eine Mischung aus der D- und L-Form. Das Verhältnis zwischen beiden Formen unterscheidet sich von Charge zu Charge. Dies hat wichtige Konsequenzen, wenn synthetisches Metanephrin eingesetzt wird, um natürliche Proben anzureichern. Da nur etwa 50% dieses synthetischen D-/L-Metanephrins – nämlich nur die L-Form - mit dem Testkit detektiert werden kann, werden angereicherte Proben zu niedrig gemessen. Deshalb sollten nur natürliche Proben verwendet werden.*

1.2 Klinische Anwendung

Metanephrine und Normetanephrine sind Metaboliten der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin und werden zum Teil im Körper weiter metabolisiert oder direkt über den Urin ausgeschieden. Patienten mit einem Phäochromozytom oder anderen neuroendokrinen Tumoren weisen eine erhöhte Konzentration der Metanephrine bzw. Normetanephrine im Urin auf. Da die Metanephrin/ Normetanephrin Sekretion aus den neuroendokrinen Zellen phasenweise stark schwanken, soll 24 Stunden Urin verwendet werden.

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

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

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

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

- (1) Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter *Verwendungszweck* (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (4) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Alle Reagenzien des Kits, 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.
- (6) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder hochreines Wasser verwenden.
- (7) Das radioaktive Material (¹²⁵Iod, 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. Gemäß den Vorschriften muss dem Lieferanten ein Exemplar der aktuellen strahlenschutzrechtlichen Genehmigung des Kunden vorliegen. Bestellungen können erst versandt werden, wenn die Genehmigung beim Lieferanten eingegangen ist (Strahlenschutzverordnung vom 30. Juni 1989).
- (8) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.

- (9) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (10) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Röhrchen sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (11) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (12) Bei jeder Testanwendung muss eine Kalibrierkurve erstellt werden.
- (13) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (14) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (15) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe die Sicherheitsdatenblätter (MSDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (16) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (17) 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.
- (18) 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

Sammelurin

Probenvorbereitung beachten! Ist der Säuregehalt des 24h-Sammelurins zu hoch, reicht die Pufferkapazität des Azylierungspuffers nicht aus. In der Folge werden Metanephrin und Normetanephrin nicht mehr quantitativ azyliert.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

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

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

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

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA D-0023 REAC-TUBES **Reaction Tubes** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Reaktionsröhrchen in einem wiederverschließbaren Beutel

Volumen: 2 x 50 Röhrchen

BA R-0025 PREC-REAG **Precipitating Reagent - Gebrauchsfertig**

Inhalt: Ziege anti-Kaninchen Serum in PEG Phosphatpuffer

Volumen: 2 x 55 ml/ Fläschchen, Deckel weiß

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

Inhalt: 0,25 M Salzsäure, gelb gefärbt

Volumen: 1 x 30 ml/Fläschchen, Deckel dunkelgrün

BA R-0012 ACYL-CONC **Acylation Concentrate** - konzentriert

Inhalt: Konzentriertes Azylierungsreagenz

Volumen: 1 x 0,5 ml/ Fläschchen

Mögliche Gefahren:



H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

BA R-0075 ACYL-DILUENT **Acylation Diluent** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Dimethylsulfoxid

Volumen: 1 x 4 ml/ Fläschchen, Deckel dunkelgrau

BA R-0120 ¹²⁵I ADR MN **¹²⁵I – Metanephrine** - GebrauchsfertigInhalt: ¹²⁵I markiertes Metanephrine, rot gefärbt

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

Mögliche Gefahren:



Radioaktiv, Aktivität < 200 kBq

BA R-0220 ¹²⁵I NAD NMN **¹²⁵I – Normetanephrine** - GebrauchsfertigInhalt: ¹²⁵I markiertes Normetanephrine, rot gefärbt

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

Mögliche Gefahren:



Radioaktiv, Aktivität < 200 kBq

BA R-8410 AS MN **Metanephrine Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Kaninchen Anti-Metanephrin Antiserum, blau gefärbt

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

BA R-8510 AS NMN **Normetanephrine Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Kaninchen Anti-Normetanephrin Antiserum, gelb gefärbt

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

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

| Artikelnr. | Komponente | Deckelfarbe | Konzentration ng/ml | | Konzentration nmol/l | | Volumen/ Fläschchen |
|------------------|--|-------------|--|---|--|---|------------------------|
| | | | MN | NMN | MN | NMN | |
| BA R-8601 | STANDARD A | weiß | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 ml |
| BA R-8602 | STANDARD B | hellgelb | 20 | 30 | 101 | 164 | 4 ml |
| BA R-8603 | STANDARD C | orange | 60 | 90 | 304 | 491 | 4 ml |
| BA R-8604 | STANDARD D | dunkelblau | 200 | 300 | 1014 | 1638 | 4 ml |
| BA R-8605 | STANDARD E | hellgrau | 600 | 900 | 3042 | 4914 | 4 ml |
| BA R-8606 | STANDARD F | schwarz | 2000 | 3000 | 10140 | 16380 | 4 ml |
| BA R-8651 | CONTROL 1 | hellgrün | Die zu erwartenden Konzentrationen | | | | 4 ml |
| BA R-8652 | CONTROL 2 | dunkelrot | und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben. | | | | 4 ml |

Umrechnung: Metanephrin (ng/ml) x 5,07 = Metanephrin (nmol/l)
Normetanephrin (ng/ml) x 5,46 = Normetanephrin (nmol/l)

Inhalt: Saurer Puffer mit quecksilberfreien Konservierungsmitteln, aufgestockt mit einer definierten Menge Metanephrin und Normetanephrin

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

Inhalt: TRIS Puffer

Volumen: 1 x 30 ml/Fläschchen, Deckel weiß

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

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 – 3000 µl
- Polystyrol RIA-Röhrchen mit passendem Ständer
- Zentrifuge (möglichst mit Kühlung), mind. 3000 x g
- Absaug- oder Dekantiervorrichtung
- Vortex-Mischer
- Gamma Counter
- Temperatur- kontrolliertes Wasserbad (37°C und 90°C) oder ähnliche Heizvorrichtung
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)

5. Probenmaterial und Lagerung

Es kann Spontan- oder 24-Stunden-Sammelurin verwendet werden (im Sammelbehälter werden zur Stabilisierung des Sammelurins 10 - 15 ml 6 M HCl vorgelegt).

Für die quantitative Bestimmung der im Verlauf eines Tages ausgeschiedenen Mengen an Metanephrin und Normetanephrin ist es notwendig, das Volumen des Tagesurins zu bestimmen und für die spätere Auswertung der Ergebnisse zu notieren.

Lagerung: für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Direktes Sonnenlicht, sowie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

Alle Reagenzien und Proben, mit Ausnahme des **PREC-REAG**, müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.



Es ist erforderlich, die Röhrchen 1 Min bei 500 x g zu zentrifugieren, falls sich nach den jeweiligen Pipettierschritten Flüssigkeitsreste am Röhrchenrand befinden sollten.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Azylierungslösung



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

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


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




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

6.2 Probenvorbereitung und Azylierung

Hydrolyse

| |
|---|
| 1. Jeweils 25 µl der Standards, Kontrollen und Urinproben in die entsprechenden REAC-TUBES pipettieren. |
| 2. 250 µl HCl in alle REAC-TUBES hinzufügen |
| 3. Die REAC-TUBES sorgfältig mischen (Vortex) und 30 Min bei 90 °C inkubieren. |
| 4. Die REAC-TUBES auf Raumtemperatur abkühlen lassen. |
|  Sollte ausschließlich das freie Metanephrin und freie Normetanephrin bestimmt werden, wird keine Hydrolyse durchgeführt (d.h. Punkt 3 und 4 werden ausgelassen). |

Azylierung

| | | | | | |
|---|--|--------------------|--------------|-----------------------|--------------|
| 5. | Jeweils 250 µl ACYL-BUFF in alle REAC-TUBES pipettieren. | | | | |
| 6. | 25 µL Azylierungslösung (siehe 6.1) in alle REAC-TUBES pipettieren. | | | | |
| 7. | Sorgfältig mischen (Vortex) und für 15 Min bei RT (20 – 25 °C) inkubieren. | | | | |
| 8. | 1 ml Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in alle REAC-TUBES hinzufügen. | | | | |
|  | Für den nachfolgenden RIA werden folgende Volumina benötigt: | | | | |
| | <table border="1" style="display: inline-table; margin-right: 20px;"> <tr> <td>Metanephrin</td> <td>25 µl</td> </tr> </table> <table border="1" style="display: inline-table;"> <tr> <td>Normetanephrin</td> <td>25 µl</td> </tr> </table> | Metanephrin | 25 µl | Normetanephrin | 25 µl |
| Metanephrin | 25 µl | | | | |
| Normetanephrin | 25 µl | | | | |

6.3 Metanephrin RIA

| | |
|-----|---|
| 1. | Jeweils 25 µl des azylierten Standard A in die Polystyrol Röhrchen für die NSB pipettieren. |
| 2. | Jeweils 25 µl der azylierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren. |
| 3. | 50 µl ¹²⁵ I ADR MN in alle Röhrchen pipettieren. |
| 4. | 50 µl AS MN in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T und NSB) pipettieren. |
| 5. | Röhrchen abdecken und 1 Stunde bei 37°C inkubieren. |
| 6. | Das vorgekühlte (2 - 8 °C) PREC-REAG gründlich aufschütteln und jeweils 500 µl in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T) pipettieren; Röhrchen kurz mischen. |
| 7. | 15 Min bei 2 - 8 °C inkubieren. |
| 8. | 15 Min bei 3000 x g , möglichst mit Kühlung, zentrifugieren. |
| 9. | Überstand absaugen oder vorsichtig dekantieren (außer Totalaktivität T) . Röhrchen ausklopfen und für 2 Minuten umgedreht stehen lassen. |
| 10. | Röhrchen 1 Minute in einem Gamma Counter messen . |

6.4 Normetanephrin RIA

| | |
|-----|---|
| 1. | Jeweils 25 µl des azylierten Standard A in die Polystyrol Röhrchen für die NSB pipettieren. |
| 2. | Jeweils 25 µl der azylierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren. |
| 3. | 50 µL ¹²⁵ I NAD NMN in alle Röhrchen pipettieren. |
| 4. | 50 µL AS NMN in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T und NSB) pipettieren. |
| 5. | Röhrchen abdecken und 1 Stunde bei 37°C inkubieren. |
| 6. | Das vorgekühlte (2 - 8 °C) PREC-REAG gründlich aufschütteln und jeweils 500 µl in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T) pipettieren; Röhrchen kurz mischen. |
| 7. | 15 Min bei 2 - 8 °C inkubieren. |
| 8. | 15 Min bei 3000 x g , möglichst mit Kühlung, zentrifugieren. |
| 9. | Überstand absaugen oder vorsichtig dekantieren (außer Totalaktivität T) . Röhrchen ausklopfen und für 2 Minuten umgedreht stehen lassen. |
| 10. | Röhrchen 1 Minute in einem Gamma Counter messen . |

7. Berechnung der Ergebnisse

| Messbereich | Metanephrin | Normetanephrin |
|-------------|-----------------|-----------------|
| | 13 – 2000 ng/ml | 11 – 3000 ng/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 unbekanntenen Proben ermittelt werden kann, wird nach Auftragen der (B-NSB)/(B₀-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 **Urinproben und Kontrollen** können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

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

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

Beispiel

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

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

Umrechnung

Metanephrin (ng/ml) x 5,07 = Metanephrin (nmol/l)

Normetanephrin (ng/ml) x 5,46 = Normetanephrin (nmol/l)

Erwartete Referenzwerte

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

| | Metanephrin | Normetanephrin |
|------------|--------------------|-----------------------|
| Sammelurin | < 350 µg/Tag | < 600 µg/Tag |

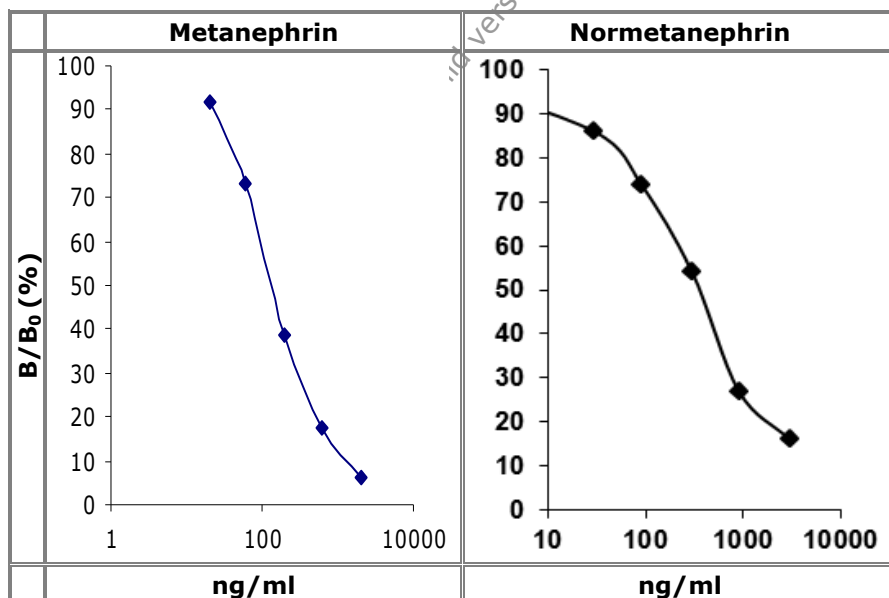
7.1 Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie entweder die Kitkontrollen und/oder andere kommerzielle Kontrollproben im normalen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

7.2 Typische Standardkurven



Beispiele, bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8. Testcharakteristika

| Analytische Sensitivität (Limit of Detection) | Metanephrin | Normetanephrin |
|--|--------------------|-----------------------|
| | 8 ng/ml | 22 ng/ml |

| | Substance | Kreuzreaktion (%) | |
|---|--|-------------------|----------------|
| | | Metanephrin | Normetanephrin |
| Analytische Spezifität (Kreuzreaktion) | Derivatisiertes Metanephrin | 100 | 0,06 |
| | Derivatisiertes Normetanephrin | 0,33 | 100 |
| | Derivatisiertes 3-Methoxytyramin | < 0,02 | 0,08 |
| | Adrenalin | 0,03 | < 0,01 |
| | Noradrenalin | < 0,02 | 1,07 |
| | Dopamin | < 0,02 | 0,01 |
| | Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure, L-Dopa, L-Tyrosin, Tyramin | < 0,02 | < 0,01 |

| Präzision | | | | | | | |
|--------------------|-------|-----------------|--------|--------------------|-------|-----------------|--------|
| Intra-Assay | | | | Inter-Assay | | | |
| | Probe | Bereich (ng/ml) | CV (%) | | Probe | Bereich (ng/ml) | CV (%) |
| Metanephrin | 1 | 56 ± 5,9 | 10,6 | Metanephrin | 1 | 43,6 ± 3,6 | 6,2 |
| | 2 | 304 ± 23 | 7,6 | | 2 | 279 ± 26 | 9,3 |
| Normetanephrin | 1 | 230 ± 36 | 15,8 | Normetanephrin | 1 | 372 ± 78 | 20,8 |
| | 2 | 1 095 ± 73 | 6,6 | | 2 | 1142 ± 179 | 15,7 |

| Linearität | | Bereich (ng/ml) | Serielle Verdünnung bis: | Mittel (%) |
|-------------------|----------------|-----------------|--------------------------|------------|
| | Metanephrin | 42 - 803 | 1:16 | 109 |
| | Normetanephrin | 105 - 2528 | 1:16 | 90 |

| Wiederfindung | | Probe | Bereich (%) | Mittelwert (%) |
|----------------------|-------------|----------|-------------|----------------|
| | Metanephrin | 1 | 73 - 121 | 94 |
| | | 2 | 85 - 122 | 103 |
| Normetanephrin | 1 | 86 - 111 | 100 | |

| Methodenvergleich zur HPLC* | Metanephrin | HPLC = 1,02 RIA - 0,3 | r = 0,99; n = 21 |
|------------------------------------|----------------|-----------------------|------------------|
| | Normetanephrin | HPLC = 1,1 RIA - 0,3 | r = 0,99; n = 21 |

*Die Werte wurden mit dem RIA und einer HPLC-Methode (externe QC-Proben von UK-NEQUAS) bestimmt. Die Korrelation zwischen RIA und HPLC ist ausgezeichnet. Es ist zu beachten, dass die UK-NEQUAS Kontrollwerte dem Mittelwert der von ca. 40 verschiedenen HPLC- Anwendern angegebenen Werte entsprechen und immer eine pathologische Probe pro Aussendung enthalten.







9. Referenzen/Literatur

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

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 | LOT | Chargennummer | IVD | In vitro Diagnostikum |
|  | Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen | CONT | Inhalt | CE | CE gekennzeichnet |
|  | Achtung | REF | Katalog-Nummer | RUO | Nur für Forschungszwecke |