Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Straße 2
24145 Kiel, Germany

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

Instructions for use / Gebrauchsanweisung

Normetanephrine Plasma ELISA

REF **DEE8200**

2°C – 8°C | Σ 96 | IVD | CE

Table of contents

1.	Introduction	4
1.1	Intended use and principle of the test	4
1.2	Clinical application	4
2.	Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations	4
2.1	Procedural cautions, guidelines and warnings	4
2.2	Limitations	5
2.2.1	Interfering substances and proper handling of specimens	5
2.2.2	Drug and food interferences	5
2.2.3	High-Dose-Hook effect	5
3.	Storage and stability	5
4.	Materials	5
4.1	Contents of the kit	5
4.2	Calibration and Controls	7
4.3	Additional materials required but not provided in the kit	7
4.4	Additional equipment required but not provided in the kit	7
5.	Sample collection, handling and storage	8
6.	Test procedure	8
6.1	Preparation of reagents and further notes	8
6.2	Preparation of samples – Extraction	9
6.3	Normetanephrine ELISA	9
7.	Calculation of results	10
7.1	Expected reference value	10
7.2	Typical standard curve	10
8.	Control samples	11
9.	Assay characteristics	11
9.1	Performance data	11
9.2	Metrological Traceability	12
10.	References/Literature	12
11.	Changes	13

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	14
1.1	Verwendungszweck und Testprinzip	14
1.2	Klinische Anwendung	14
2.	Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen	14
2.1	Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen	14
2.2	Grenzen des Tests	15
2.2.1	Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben	15
2.2.2	Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel	15
2.2.3	High-Dose-Hook Effekt	15
3.	Lagerung und Haltbarkeit	15
4.	Materialien	15
4.1	Reagenzien im Kit	15
4.2	Kalibratoren und Kontrollen	18
4.3	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien	18
4.4	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte	18
5.	Probensammlung, -behandlung und -lagerung	18
6.	Testdurchführung	18
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise	19
6.2	Probenvorbereitung – Extraktion	19
6.3	Normetanephrin ELISA	20
7.	Berechnung der Ergebnisse	20
7.1	Erwartete Referenzbereiche	20
7.2	Typische Standardkurve	21
8.	Kontrollproben	21
9.	Assaycharakteristika	21
9.1	Leistungsdaten	21
9.2	Metrologische Rückführbarkeit	22
10.	Referenzen/Literatur	23
11.	Änderungen	24

Related Products:

- Metanephrine Plasma ELISA Fast Track
- 2-MET Plasma ELISA Fast Track

English

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of free normetanephrine in plasma. The determination of normetanephrine helps in the detection of paragangliomas and pheochromocytomas.
Normetanephrine (normetadrenaline) 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 H_2SO_4. 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 normetanephrine is always a mixture of the D- and L-form. This has important implications if synthetic normetanephrine 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 normetanephrine 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 1 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 0.25 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-0231	**III** **NAD** **NMN**	**Normetanephrine Microtiter Strips** – ready to use
Content:	1 x 96 wells (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable yellow pouch with desiccant	

BA E-8210	**NMN-AS**	**Normetanephrine Antiserum** – ready to use
Content:	Rabbit anti-normetanephrine antibody in buffer with proteins and non-mercury preservative, yellow coloured	
Volume:	1 x 6 ml/vial, yellow 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** **96** **Extraction Plate** – ready to use
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] NMN	Concentration [pmol/l] NMN	Volume/ Vial
BA E-8301	**STANDARD** **A**	white	0	0	4 ml
BA E-8302	**STANDARD** **B**	yellow	72	393	4 ml
BA E-8303	**STANDARD** **C**	orange	240	1,310	4 ml
BA E-8304	**STANDARD** **D**	blue	720	3,931	4 ml
BA E-8305	**STANDARD** **E**	grey	2,400	13,104	4 ml
BA E-8306	**STANDARD** **F**	black	7,200	39,312	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: normetanephrine [pg/ml] x 5.46 = normetanephrine [pmol/l]

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

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!

Normetanephrine 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**.
	Alternatively *pipette* ***25 µl*** *of* ***standards*** *and* ***controls.***
2.	Add **20 µl STANDARD A** to all wells intended for the **plasma samples**.
	Alternatively *add* ***25 µl*** **STANDARD A**.
3.	Add **200 µl** of **EQUA-REAG** to the wells with **standards and controls.**
	Alternatively *add* ***250 µl*** *of* **EQUA-REAG**.
4.	Pipette **200 µl** of **plasma samples** to the respective wells.
	Alternatively *pipette* ***250 µl*** *of* ***plasma samples.***
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.
	Alternatively *pipette* ***125 µl*** *of* **ELUTION-BUFF**.
	Please note: The colour changes caused by the elution buffer can vary between standards and samples.
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:
	Normetanephrine 25 µl

6.3 Normetanephrine ELISA

1.	Pipette **25 µl** of **ADJUST-BUFF** into all wells of the **Normetanephrine Microtiter Strips Ш NAD NMN**.
2.	Pipette **25 µl** of the extracted **standards, controls and samples** into the respective wells. *Please hold the Extraction Plate at a slight angle in order to facilitate this pipetting step.*
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 **Normetanephrine Antiserum** **NMN-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	Normetanephrine
	22.8 – 7,200 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:
normetanephrine [pg/ml] x 5.46 = normetanephrine [pmol/l]

7.1 Expected reference value

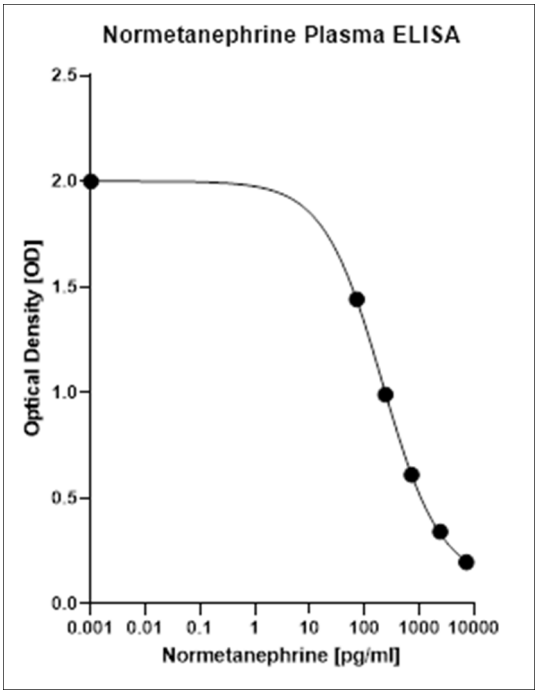
It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference values.
The expected reference values indicated below are based on method comparison studies to LC-MS/MS [2] with blood samples taken in the sitting position.

	Normetanephrine
expected reference value (ULN)	< 216 pg/ml
typical pathological range	up to 8,500 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 mediate 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	
	Normetanephrine
Limit of Blank (LOB)	11.7 pg/ml
Limit of Detection (LOD)	17.9 pg/ml
Limit of Quantification (LOQ)	22.8 pg/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	
Substance	**Cross Reactivity [%]**
	Normetanephrine
Metanephrine	0.72
Normetanephrine	100
3-Methoxytyramin	6.5*
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

* 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 secreting tumors can cause false positive results.

Precision							
Intra-Assay				**Inter-Assay**			
	Sample	Mean [pg/ml]	CV [%]		Sample	Mean [pg/ml]	CV [%]
Normetanephrine	1	149	9.5	Normetanephrine	1	156	10.6
	2	282	9.1		2	287	5.0
	3	734	8.2		3	769	5.1
	4	1,956	10.5		4	1,949	5.9

Lot-to-Lot			
	Sample	Mean ± SD [pg/ml]	CV [%]
Normetanephrine (n = 6)	1	231 ± 29.9	13.0
	2	1,688 ± 116	6.9

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

Recovery			
	Range [pg/ml]	Mean [%]	Range [%]
Normetanephrine	63.6 – 2,004	90	84 – 93

Linearity			
	Serial dilution up to	Mean [%]	Range [%]
Normetanephrine	1:64	98	92 – 102

Method Comparison: ELISA vs. LC-MS/MS [13]	
Normetanephrine	$y = 0.93x + 13$; $r^2 = 0.99$; n = 48

Diagnostic Performance [2]*				
	Diagnostic Specificity [%]	Diagnostic Sensitivity [%]	Positive Predictive Value (PPV) [%]	Negative Predictive Value (NPV) [%]
Normetanephrine	92	97	80	99
	Positive Likelihood Ratio (LR+)		Negative Likelihood Ratio (LR-)	
	12,1		0,03	

* The determination of both metanephrine and normetanephrine, using the 2-MET Plasma ELISA Fast Track BA E-8300, 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 Normetanephrine Plasma ELISA Fast Track are traceable to SI Units by weighing with quality-controlled analyte.

Standards and Controls	
	Uncertainty [%]
Normetanephrine	2.5

Normetanephrine Plasma ELISA Fast Track	
	Expanded Uncertainty [%] k = 2*
Normetanephrine	11.2

* 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 phaeochromocytoma 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.*

For updated literature or any other information please contact your local supplier.
The summary of safety and performance according to article 29 of regulation (EU) 2017/746 can be downloaded from the website www.ldn.de.

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 labeling 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

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

Zugehörige Produkte:

- Metanephrine Plasma ELISA Fast Track
- 2-MET Plasma ELISA Fast Track

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von freiem Normetanephrin in Plasma. Die Bestimmung von Normetanephrin hilft bei der Erkennung von Paragangliomen und Phäochromozytomen.
Normetanephrin (Normetadrenalin) 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 Metanephrine sowie der freien Normetanephrine 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 H_2SO_4 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 Normetanephrin ist immer eine Mischung aus der D- und L-Form. Dies hat wichtige Auswirkungen, wenn synthetisches Normetanephrin 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 Normetanephrin 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 1 mg/ml Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 0,25 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 Immunoglobuline, 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-0231	**Ш** **NAD** **NMN** **Normetanephrin Mikrotiterstreifen** – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Wells (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem gelben wiederverschließbaren Beutel
BA E-8210	**NMN-AS** **Normetanephrin Antiserum** – gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen anti-Normetanephrin Antikörper im Proteinpuffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel, gelb gefärbt
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel gelb
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** **96** **Extraktionsplatte** – gebrauchsfertig
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
Gefahren-hinweise:	H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
Sicherheits-hinweise:	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] NMN	Konzentration [pmol/l] NMN	Volumen/ Fläschchen
BA E-8301	**STANDARD A**	weiß	0	0	4 ml
BA E-8302	**STANDARD B**	gelb	72	393	4 ml
BA E-8303	**STANDARD C**	orange	240	1.310	4 ml
BA E-8304	**STANDARD D**	blau	720	3.931	4 ml
BA E-8305	**STANDARD E**	grau	2.400	13.104	4 ml
BA E-8306	**STANDARD F**	schwarz	7.200	39.312	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: Normetanephrin [pg/ml] x 5,46 = Normetanephrin [pmol/l]

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

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 Randeffekt 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!

Normetanephrin Mikrotiterstreifen
Vereinzelt können Rückstände der Blockier- und Stabilisierlösung in den Wells zu sehen sein (kleine weiße Punkte oder Linien). Diese stellen keine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes dar.

Extraktionsplatte
Vereinzelt können 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.
	Alternativ *jeweils* ***25 µl Standards*** *und* ***Kontrollen*** *pipettieren.*
2.	Jeweils **20 µl** **STANDARD** **A** zu den für die **Plasmaproben** vorgesehenen Wells hinzugeben.
	Alternativ *jeweils* ***25 µl*** **STANDARD** **A** *hinzugeben.*
3.	Jeweils **200 µl** **EQUA-REAG** in die Wells mit **Standards und Kontrollen** hinzugeben**.**
	Alternativ *jeweils* ***250 µl*** **EQUA-REAG** *hinzugeben.*
4.	Jeweils **200 µl Plasmaproben** in die entsprechenden Wells pipettieren.
	Alternativ *jeweils* ***250 µl Plasmaproben*** *pipettieren.*
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.*
	Bitte beachten: Die Farbveränderung durch Hinzupipettieren des Eluierungspuffers kann zwischen Standards und Proben variieren.
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:
	Normetanephrin 25 µl

6.3 Normetanephrin ELISA

1.	**25 µl** **ADJUST-BUFF** in alle Wells der **Ш** **NAD** **NMN** pipettieren.
2.	Jeweils **25 µl** der extrahierten **Standards, Kontrollen** und **Proben** in die entsprechenden Wells pipettieren. *Um diesen Pipettierschritt zu erleichtern, halten Sie die Extraktionsplatte bitte leicht angewinkelt.*
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 Normetanephrin Antiserum** **NMN-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	Normetanephrin
	22,8 – 7.200 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. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

Umrechnung:
Normetanephrin [pg/ml] x 5,46 = Normetanephrin [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.

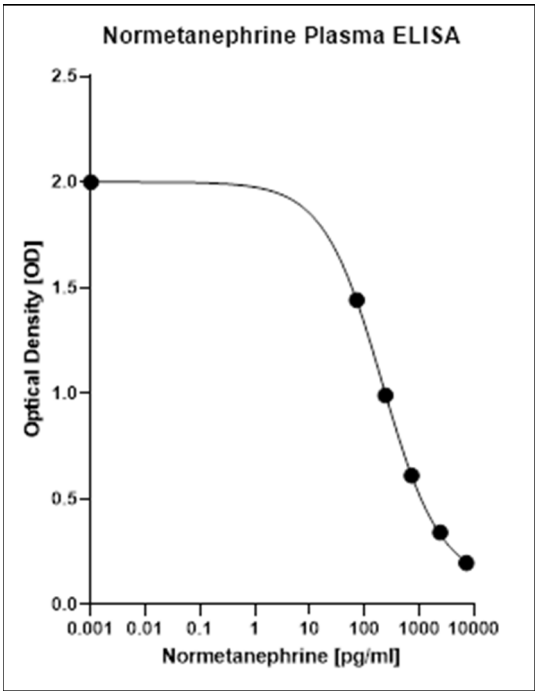
	Normetanephrin
erwarteter Referenzbereich (ULN)	< 216 pg/ml
typischer pathologischer Bereich	bis zu 8.500 pg/ml

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	
	Normetanephrin
Limit of Blank (LOB)	11,7 pg/ml
Limit of Detection (LOD)	17,9 pg/ml
Limit of Quantification (LOQ)	22,8 pg/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)	
Substanz	**Kreuzreaktion [%]**
	Normetanephrin
Metanephrin	0,72
Normetanephrin	100
3-Methoxytyramin	6,5*
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

* 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.

Präzision							
Intra-Assay				**Inter-Assay**			
	Probe	Mittelwert [pg/ml]	CV [%]		Probe	Mittelwert [pg/ml]	CV [%]
Normetanephrin	1	149	9,5	Normetanephrin	1	156	10,6
	2	282	9,1		2	287	5,0
	3	734	8,2		3	769	5,1
	4	1.956	10,5		4	1.949	5,9

Lot-zu-Lot			
	Probe	Mittelwert ± SD [pg/ml]	CV [%]
Normetanephrin (n = 6)	1	231 ± 29,9	13,0
	2	1.688 ± 116	6,9

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

Wiederfindung			
	Bereich [pg/ml]	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Normetanephrin	63,6 – 2.004	90	84 – 93

Linearität			
	Serielle Verd. bis	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Normetanephrin	1:64	98	92 – 102

Methodenvergleich: ELISA vs. LC-MS/MS [13]	
Normetanephrin	$y = 0,93x + 13$; $r^2 = 0,99$; $n = 48$

Klinische Leistung [2]*				
	Diagnostische Spezifität [%]	Diagnostische Sensitivität [%]	Positiver Prädiktiver Wert (PPV) [%]	Negativer Prädiktiver Wert (NPV) [%]
Normetanephrin	92	97	80	99
	Positives Likelihood Ratio (LR+)		Negatives Likelihood Ratio (LR-)	
	12,1		0,03	

* Die Bestimmung von Metanephrin und Normetanphrin unter Verwendung des 2-MET Plasma ELISA Fast Track BA E-8300 führt zu einer besseren klinischen Leistung (diagnostische Sensitivität 100% und diagnostische Spezifität 96%).

9.2 Metrologische Rückführbarkeit

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

Standards und Kontrollen	
	Unsicherheit [%]
Normetanephrin	2,5

Normetanephrine Plasma ELISA Fast Track	
	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
Normetanephrin	11,2

* 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 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 phaeochromocytoma 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.*

Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anfrage von Ihrem Anbieter gerne zur Verfügung gestellt.
Der Kurzbericht über Sicherheit und Leistung gemäß Artikel 29 der Verordnung (EU) 2017/746 kann über die Website www.ldn.de heruntergeladen werden.

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

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten	CONT	Inhalt		CE-Kennzeichnung
	Achtung	REF	Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				