



IMMUNOASSAYS AND SERVICES

BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

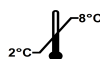
LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Instructions for use

3-Methoxytyramine Plasma RIA **Fast Track**

REF

BA R-8800



IVD



200 kBq

3-Methoxytyramine Plasma RIA Fast Track**1. Introduction****1.1 Intended use and principle of the test**

¹²⁵I – Radioimmunoassay for the quantitative determination of free 3-Methoxytyramine (3-MT) in plasma.

Related Products:

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

3-Methoxytyramine is first extracted using an ion exchange matrix followed by an acylation process.

The assay procedure uses 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 reference curve prepared with known standards.

1.2 Clinical application

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

Recent studies and publications have shown that the quantification of plasma free Metanephrine, plasma free Normetanephrine and plasma free 3-Methoxytyramine is the most accurate biochemical marker for the clinical diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma as well as the follow-up of pheochromocytoma and paraganglioma patients.

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

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

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

2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations**2.1 Precautions, guidelines and warnings**

- (1) This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and has to be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for a certain type of sample as indicated in *Intended Use* (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) Reagents of this kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- (4) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (5) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (6) All kit reagents and specimens – with the exception of Precipitating Reagent - should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (8) The radioactive material (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. Products are dispatched on the basis of the nuclear and radiation protection regulations.
- (9) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (10) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.

- (11) Incubation times do influence the results. All tubes should be handled in the same order and time intervals.
- (12) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (13) A standard curve must be established for each run.
- (14) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report.
- (15) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (16) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (17) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (18) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
- (19) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed according to national regulations.

2.2 Limitations

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

2.2.1 Interfering substances

Plasma

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

2.2.2 Drug interferences

Please refer to point "Sample collection and storage".

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

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

4. Materials

4.1 Content of the kit

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Ready to use
Content:	Adhesive Foils in a resealable pouch	
Volume:	1 x 4 foils	
BA R-0030	PREC-REAG	Precipitating Reagent - Ready to use
Content:	Goat anti-rabbit serum in PEG phosphate buffer	
Volume:	1 x 55 ml/vial, yellow cap	
BA R-0320	¹²⁵I DOP	¹²⁵I – Dopamine / 3-Methoxytyramine - Ready to use
Content:	¹²⁵ I labeled 3-Methoxytyramine, red coloured	
Volume:	1 x 5.5 ml/vial, dark green cap	
Hazards identification:	 Radioactive, activity < 200 kBq	
BA R-6310	AS DOP	Dopamine/3-Methoxytyramine Antiserum - Ready to use
Content:	Rabbit anti- 3-Methoxytyramine antibody, green coloured	
Volume:	1 x 5.25 ml/vial, dark green cap	
BA E-2442	EXTRACT-PLATE 48	Extraction Plate - Ready to use
Content:	2 x 48 well plate, precoated with cation exchanger in a resealable pouch	

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

Content: Buffer with sodium acetate

Volume: 1 x 20 ml/vial, brown cap

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

Content: 0.1 M sodium hydroxide, dark purple coloured

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

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

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

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

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration	Concentration	Volume/Vial
			pg/ml 3-MT	pmol/l 3-MT	
BA R-8801	STANDARD A	white	0	0	6 ml
BA R-8802	STANDARD B	light yellow	2	12	4 ml
BA R-8803	STANDARD C	orange	5	30	4 ml
BA R-8804	STANDARD D	dark blue	15	90	4 ml
BA R-8805	STANDARD E	light grey	50	299	4 ml
BA R-8806	STANDARD F	black	150	897	4 ml
BA R-8851	CONTROL 1	light green	Refer to QC report for expected value and acceptable range!		4 ml
BA R-8852	CONTROL 2	dark red			4 ml

Conversion: 3-Methoxytyramine (pg/ml) x 5.98 = 3-Methoxytyramine (pmol/l)

Content: Acidic buffer with non-mercury stabilizer, spiked with a defined quantity of 3-Methoxytyramine

BA R-8811 **ACYL-BUFF** **Acylation-Buffer** – Ready to use

Content: 0.24 M HCl

Volume: 1 x 3ml/vial, brown cap

BA R-8823 **ACYL-TUBES** **Acylation-Tubes** – Ready to use

Content: PS tubes coated with acylation reagent in a resealable pouch

Volume: 4 x 25 tubes

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

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

Volume: 3 x 14 ml, white cap

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

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 25 – 1 000 µl
- RIA tubes (Polystyrene) for Total counts (T)
- Suitable rack for RIA tubes
- Centrifuge (preferable refrigerated) capable of at least 3 000 x g
- Suitable device for aspirating or decanting the tubes
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Gamma Counter
- Vortex mixer
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)

5. Sample collection and storage

Medications like Serotonin-Noradrenaline reuptake inhibitors, tricyclic antidepressants, MAO inhibitors, antihypertensive drugs and L-DOPA can influence 3-Methoxytyramine level. People who are taking such medication should consult with their doctor before specimen collection.

Sympathomimetic agents, sport and smoking can influence 3-Methoxytyramine level.

Alcohol and caffeinated drinks should be avoided the day before and including the day of sample collection.

Consumption of food products that contain substantial quantities of biogenic amines (e.g. chocolate, some fruits (e.g. banana, pineapple), fruit drinks, nuts, tomatoes) can cause significant increase in plasma free 3-Methoxytyramine level. Dietary restrictions are necessary prior to sampling.

EDTA- or Heparin-Plasma

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

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

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

Repeated freezing and thawing should be avoided.

6. Test procedure

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

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

6.1 Preparation of reagents

Cleaning Buffer

Dilute the 20 ml Cleaning Concentrate (BA R-8325) with water (deionized, distilled, or ultra-pure) to a final volume of 500 ml.

Storage: 1 month 2 - 8 °C

6.2 Preparation of samples

 *Due to a cross reaction of the 3-Methoxytyramine antiserum to Normetanephine, the Normetanephine plasma concentrations should be determined parallel to this assay. Please refer to point 7 for the correction of the 3-Methoxytyramine result.*

6.3 Extraction

1.	Pipette 50 µl of standards and controls into the respective wells of the Extraction Plate .
2.	Add 50 µl Standard A to all wells for plasma samples .
3.	Add 750 µl of Equalizing Reagent to the wells with standards and controls .
4.	Pipette 750 µl of plasma samples to the respective wells.
5.	Incubate plate 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.	Wash the plate 3 x by adding 1 ml of Cleaning Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Pipette 100 µl of Elution Buffer into all wells.
9.	Cover plate with adhesive foil. Incubate 15 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Remove the foil.
	<i>Do not decant the supernatant thereafter!</i> 90 µl of the supernatant are needed for the subsequent RIA (Step 3 next Chapter)

6.4 3-Methoxytyramine RIA

⚠ *Acylation tubes are used for the RIA!*

For determination of the total counts you can use usual Polystyrene RIA tubes.

1.	Pipette 25 µl of Acylation Buffer into all Acylation Tubes (except totals) . The Acylation Tubes can be used only once!
	<i>Do not change pipetting order at this stage (always Acylation Buffer first)!</i>
2.	Pipette 90 µl of Elution Buffer into the Acylation Tubes for the NSB .
3.	Pipette 90 µl of the extracted standards, controls and samples into the respective Acylation Tubes .
	⚠ <i>Due to the low elution volume it is advisable to hold the Extraction Plate tilted (~ 45°) while the standards, controls and samples are pipetted into the tubes.</i>
4.	Pipette 25 µl of Adjustment Buffer into all tubes (except totals) .
5.	Mix thoroughly (vortex) and incubate for 15 min at RT (20 - 25 °C).
6.	Pipette 50 µl of Dopamine/3-Methoxytyramine Antiserum into all tubes (except totals and NSB) ; mix thoroughly (vortex).
7.	Cover tubes. Incubate for 1 h at RT (20 - 25 °C).
8.	Pipette 50 µl of the ¹²⁵I Dopamine/3-Methoxytyramine into all tubes and mix thoroughly (vortex). Pipette also 50 µl of the ¹²⁵I Dopamine/3-Methoxytyramine into additional empty polystyrene tubes for determination of the total counts .
9.	Cover tubes. Incubate for 15 - 20 h (overnight) at 2 - 8 °C .
	⚠ <i>Avoid a temperature gradient within the rack during incubation!</i>
10.	Mix the chilled (2 - 8 °C) Precipitating Reagent thoroughly, pipette each 500 µl into all tubes (except totals) , and mix on a vortex.
11.	Incubate for 15 min at 2 - 8 °C .
12.	Centrifuge for 15 min at 3 000 x g , if possible in a refrigerated centrifuge.
	⚠ <i>Continue without any delay with step 13.</i>
13.	Decant or aspirate the supernatant carefully (except totals) . Blot the tubes dry (on absorbent material) and leave them upside for 2 minutes.
14.	Count all tubes for 1 min in a gamma counter.

7. Calculation of results

Measuring range	3-Methoxytyramine
	1.95 – 150 pg/ml

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

The standard curve, from which the concentrations in the samples can be taken, is obtained by using the percentage of (B-NSB)/ (B₀-NSB) measured for the standards (linear, y-axis) against the corresponding concentrations (logarithmic, x-axis).

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

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

Controls:

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

⚠ **Plasma samples:**

The concentrations read from the standard curve have to be corrected for Normetanephrine cross reactivity:

Effective 3-MT-concentration = read [3-MT pg/ml] - 0.008 x [Normetanephrine pg/ml]

Example

The 3-Methoxytyramine concentration taken from the standard curve is 10 pg/ml. The determined Normetanephrine concentration from the same sample is 350 pg/ml.

Effective 3-MT-concentration:

$$10 \text{ pg/ml} - 0.008 \times 350 \text{ pg/ml} = 7.2 \text{ pg/ml}$$

Samples found with concentrations higher than the highest standard (Standard F) should be diluted accordingly with Equalizing Reagent (BA R-8828) and have to be re-assayed.

Conversion

$$3\text{-Methoxytyramine (pg/ml)} \times 5.98 = 3\text{-Methoxytyramine (pmol/l)}$$

Expected reference values

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

In a study conducted with EDTA Plasma of apparently normal healthy donors (n = 125, blood samples taken in sitting position), using the 3-Methoxytyramine Plasma RIA ^{Fast Track} the following value was observed.

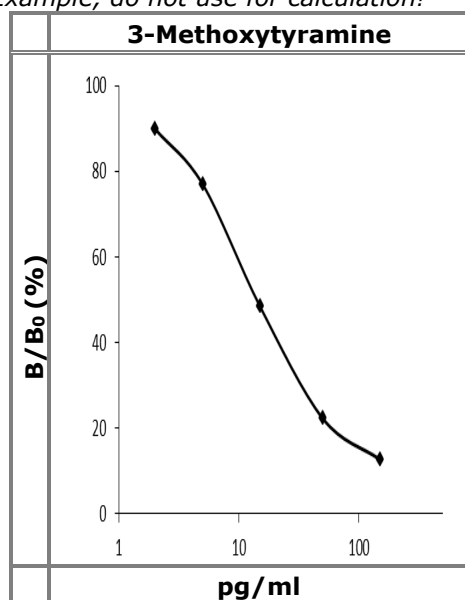
3-Methoxytyramine
< 8 pg/ml

7.1 Quality control

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

7.2 Typical standard curve

 Example, do not use for calculation!



8. Assay characteristics

Analytical Sensitivity		3-Methoxytyramine
	LOD (pg/ml)	1.10
	LOQ (pg/ml)	1.95

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)
	Normetanephrine	1.34
	Metanephrine	<0.01
	Adrenaline	<0.01
	Noradrenaline	<0.01
	Dopamine	<0.01
	Vanillic mandelic acid	<0.01
	Homovanillic acid	<0.01
	L-DOPA	<0.01
	L-Tyrosin	<0.01
	Tyramine	0.04

Precision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample	Mean (pg/ml)	CV (%)	Sample	Mean (pg/ml)	CV (%)
1	5.9	13.5	1	4.9	13.0
2	8.6	11.4	2	7.4	12.2
3	17.4	10.9	3	15.3	13.6
4	30.6	12.8	4	27.7	13.1

Linearity	Serial dilution up to	Mean (%)	Range (%)
	1:64	92	81 - 96

Recovery	Mean (%)	Range (%)
	95	90 - 100

Method Comparison RIA vs LC-MS/MS⁽¹⁾	$y=0.88x + 0.081; r^2=0.99; n=49$
--	-----------------------------------

9. References/Literature

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

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

Symbols:

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

1. Einleitung**1.1 Verwendungszweck und Testprinzip**

¹²⁵I – Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von freiem 3-Methoxytyramin (3-MT) in Plasma.

Related Products:

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

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

1.2 Klinische Anwendung

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

Aktuelle Studien und Publikationen zeigen, dass die Quantifizierung des freien Metanephrins, des freien Normetanephrins sowie des freien 3-Methoxytyramins in Plasma klinisch relevante biochemischen Marker für die Diagnose sowie der Verlaufsbeurteilung von Phäochromozytomen und Paragangliomen sind.

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

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

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

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

- (1) Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter *Verwendungszweck* (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die humanes Serum oder Plasma enthaltenden Reagenzien des Kits wurden mit geprüften Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Dennoch sollten sämtliche Reagenzien bei der Handhabung und Entsorgung als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandelt werden.
- (4) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (5) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (6) Alle Reagenzien des Kits – außer dem Precipitation Reagent – sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra pures Wasser verwenden.
- (8) Das radioaktive Material (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. Der Vertrieb des Produktes erfolgt unter Beachtung der strahlenschutzrechtlichen Bestimmungen.

- (9) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (10) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (11) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Röhrchen sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (12) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (13) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (14) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (15) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (16) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe die Sicherheitsdatenblätter (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (17) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (18) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen im Zusammenhang mit anderen diagnostischen Untersuchungen und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.
- (19) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

2.2 Grenzen des Tests

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

2.2.1 Interferenzen

Plasma

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

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bitte Punkt 5 "Probenmaterial und Lagerung" beachten!

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

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

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Gebrauchsfertig
Inhalt:	4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Volumen:	1 x 4 Folien	
BA R-0030	PREC-REAG	Precipitating Reagent - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege anti-Kaninchen Serum in PEG Phosphatpuffer	
Volumen:	1 x 55 ml/ Fläschchen, Deckel gelb	

BA R-0320 ¹²⁵I **DOP** **¹²⁵I – Dopamine / 3-Methoxytyramine** - GebrauchsfertigInhalt: ¹²⁵I markiertes 3-Methoxytyramin, rot gefärbt

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

Mögliche
Gefahren:

Radioaktiv, Aktivität < 200 kBq

BA R-6310 **AS DOP** **Dopamin/3-Methoxytyramin Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Kaninchen Anti- 3-Methoxytyramin Antikörper, grün gefärbt

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

BA E-2442 **EXTRACT-PLATE 48** **Extraction Plate** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 2 x 48 Well Platte, beschichtet mit Kationenaustauscher in einem wiederverschließbaren Beutel

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

Inhalt: Natriumacetatpuffer

Volumen: 1 x 20 ml/ Fläschchen, Deckel braun

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

Inhalt: 0,1 M Natriumhydroxid, dunkellila gefärbt

Volumen: 1 x 14 ml/ Fläschchen, Deckel dunkelgrün

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

Content: TRIS Puffer mit BSA und quecksilberfreien Stabilisatoren

Volume: 1 x 6 ml/ Fläschchen, Deckel lila

Standards and Controls - Ready to use

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration	Konzentration	Volumen/ Fläschchen
			pg/ml 3-MT	pmol/l 3-MT	
BA R-8801	STANDARD A	weiß	0	0	6 ml
BA R-8802	STANDARD B	hellgelb	2	12	4 ml
BA R-8803	STANDARD C	orange	5	30	4 ml
BA R-8804	STANDARD D	dunkelblau	15	90	4 ml
BA R-8805	STANDARD E	hellgrau	50	299	4 ml
BA R-8806	STANDARD F	schwarz	150	897	4 ml
BA R-8851	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC Report angegeben.		4 ml
BA R-8852	CONTROL 2	dunkelrot			4 ml

Umrechnung: 3-Methoxytyramin (pg/ml) x 5,98 = 3-Methoxytyramin (pmol/l)

Inhalt: Saurer Puffer mit quecksilberfreien Stabilisatoren, aufgestockt mit definierten Mengen an 3-Methoxytyramin.

BA R-8811 **ACYL-BUFF** **Acylation-Buffer** – Gebrauchsfertig

Inhalt: 0,24 M HCl

Volumen: 1 x 3 ml/Fläschchen, Deckel braun

BA R-8823 **ACYL-TUBES** **Acylation-Tubes** – Gebrauchsfertig

Content: Azylierungsreagenz in PS Röhrchen in einem wiederverschließbaren Beutel

Volume: 4 x 25 Röhrchen

BA R-8828 **EQUA-REAG** **Equalizing-Reagenz** - Gebrauchsfertig

Content: Humanserum, negativ auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet

Volume: 2 x 14 ml/ Fläschchen, Deckel weiß

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

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 25 – 1000 µl
- RIA-Röhrchen (Polystyrol) für Totalaktivität T
- Passender Ständer für die RIA-Röhrchen
- Zentrifuge (möglichst mit Kühlung), mind. 3000 x g
- Absaug- oder Dekantiervorrichtung
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Gamma Counter
- Vortex-Mischer
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)

5. Probenmaterial und Lagerung

Medikamente wie Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer, trizyklische Antidepressiva, MAO Inhibitoren, blutdrucksenkende Mittel und L-DOPA können den 3-Methoxytyramin Konzentration im Plasma beeinflussen. Patienten, die diese Medikamente einnehmen, sollten vor Blutabnahme ihren behandelnden Arzt konsultieren. Sympathomimetika, Sport und Rauchen können ebenfalls den 3-Methoxytyraminwert beeinflussen. Alkohol und koffeinhaltige Getränke sollten ab einem Tag vor der Blutentnahme vermieden werden.

Lebensmittel, die bedeutende Mengen biogener Amine enthalten (z.B. Schokolade, Früchte (z. B. Bananen, Ananas), Fruchtsäfte, Nüsse, Tomaten), können die Konzentration an freiem 3-Methoxytyramin in Plasma signifikant erhöhen. Vor der Probennahme sollte deshalb auf den Verzehr derartiger Lebensmittel verzichtet werden.

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.

Hämolytische und lipämische Plasmen sollten nicht eingesetzt werden.

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

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

Alle Reagenzien und Proben, mit Ausnahme des Precipitating Reagent, müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Das Markieren bzw. Nummerieren der Extraktionswells und Acylation Tubes ist erforderlich. Es empfiehlt sich, Doppelbestimmungen anzusetzen.



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

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Cleaning Puffer

20 ml Cleaning Concentrate (BA R-8325) mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 500 ml verdünnen.

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 °C

6.2 Probenvorbereitung



Auf Grund einer Kreuzreaktion des 3-Methoxytyramin Antikörpers zu Normetanephrin muss die Plasma Normetanephrinkonzentration immer parallel zu diesem Assay bestimmt werden. Weitere Informationen zur Korrektur der 3-Methoxytyramin-Ergebnisse finden Sie unter Punkt 7.

6.3 Extraktion

1.	Jeweils 50 µl Standards und Kontrollen in die entsprechenden Kavitäten der Extraction Plate pipettieren.
2.	Jeweils 50 µl Standard A zu den für die Plasmaproben vorgesehenen Kavitäten hinzugeben.
3.	Jeweils 750 µl Equalizing Reagent zu den Standards und Kontrollen hinzugeben.
4.	750 µl Plasmaproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
5.	Platte für 2 Stunde 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.	Die Platte 3 mal gründlich mit 1 ml Cleaning Puffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8.	Jeweils 100 µl Elution Buffer in alle Kavitäten pipettieren.
9.	Platte mit Folie abdecken und für 15 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) schütteln. Folie entfernen
	Überstand anschließend nicht werfen bzw. Platte nicht ausleeren! Je 90 µl vom Überstand werden für den nachfolgenden RIA benötigt (Schritt 3 im nächsten Kapitel).

6.4 3-Methoxytyramin RIA

 Für den RIA werden *Acylation Tubes* verwendet!

Für Totalaktivität *T* werden übliche RIA-Röhrchen (*Polystyrol*) verwendet.

1.	Jeweils 25 µl Acylation Buffer in alle Acylation Tubes (außer Totalaktivität T) pipettieren. Die Acylation Tubes können jeweils nur einmal verwendet werden!
	Die Reihenfolge der Pipettierschritte nicht ändern (immer zuerst den Acylation Buffer pipettieren)!
2.	Jeweils 90 µl Elution Buffer in die Acylation Tubes für die NSB pipettieren.
3.	Jeweils 90 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Acylation Tubes pipettieren.
	<i>Bitte halten Sie die Extraction Plate angewinkelt (45°) während Sie die Standards, Kontrollen und Proben in die Röhrchen pipettieren, da das Volumen in den Wells der Extraction Plate knapp bemessen ist.</i>
4.	25 µl Adjustment Buffer in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T) pipettieren.
5.	Röhrchen sorgfältig mischen (Vortex) und 15 Min bei RT (20 – 25 °C) inkubieren.
6.	50 µl Dopamine/3-Methoxytyramine Antiserum in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T und NSB) pipettieren und sorgfältig mischen.
7.	Röhrchen abdecken. 1 Stunde bei RT (20 – 25 °C) inkubieren.
8.	50 µl ¹²⁵I – Dopamine / 3-Methoxytyramine in alle Röhrchen pipettieren und sorgfältig mischen. 50 µl ¹²⁵I – Dopamine / 3-Methoxytyramine in die Leere <i>Polystyrol</i> Röhrchen für die Totalaktivität Bestimmung pipettieren.
9.	Röhrchen abdecken und 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren.
	Ein Temperaturgradient innerhalb eines Racks muss während der Inkubation vermieden werden!
10.	Das vorgekühlte (2 - 8 °C) Precipitating Reagent gründlich aufschütteln jeweils 500 µl in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T) pipettieren und sorgfältig mischen (Vortex).
11.	15 Min bei 2 - 8 °C inkubieren.
12.	15 Min bei 3000 x g , möglichst mit Kühlung, zentrifugieren .
	Umgehend mit Schritt 13 fortfahren!
13.	Überstand absaugen oder vorsichtig dekantieren (außer Totalaktivität T) . Röhrchen ausklopfen (auf saugfähigem Material) und für 2 Minuten umgedreht stehen lassen.
14.	Röhrchen 1 Minute in einem Gamma Counter messen .

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	3-Methoxytyramin
	1,95 – 150 pg/ml

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

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannten 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.

Kontrollen:

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

Plasmaproben:

 Aufgrund der Kreuzreaktivität zum Normetanephrin müssen die aus der Standardkurve abgelesenen 3-MT-Konzentrationen wie folgt korrigiert werden:

Tatsächliche 3-MT-Konzentration =

$$\text{abgelesene [3-MT pg/ml]} - 0,008 \times [\text{Normetanephrene pg/ml}]$$

Beispiel:

Es wird für 3-MT eine Konzentration von 10 pg/ml aus der Standardkurve abgelesen. Für die gleiche Probe wurde ein Normetanephrinwert von 350 pg/ml gemessen. Die tatsächliche 3-MT-Konzentration errechnet sich damit wie folgt:

$$10 \text{ pg/ml} - 0,008 \times 350 \text{ pg/ml} = 7,2 \text{ pg/ml}$$

Falls Proben Konzentrationen aufweisen sollten, die oberhalb des höchsten Standards liegen, müssen diese mit Ausgleichsreagenz (BA R-8828) verdünnt und nochmals bestimmt werden.

Umrechnung

$$3\text{-Methoxytyramin (pg/ml)} \times 5,98 = 3\text{-Methoxytyramin (pmol/l)}$$

Erwartete Referenzwerte

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

In einer Studie, die mit EDTA Plasma Proben von augenscheinlich gesunden Probanden durchgeführt wurde (n = 125, Blutabnahme im Sitzen) wurde mit diesem 3-Methoxytyramin Plasma RIA ^{Fast Track} folgender Normalbereich festgelegt.

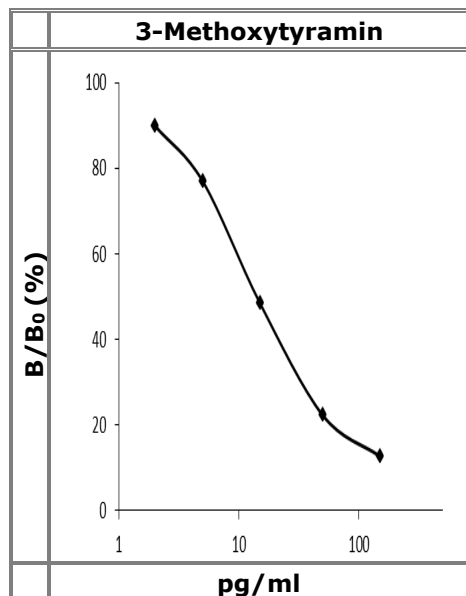
3-Methoxytyramin
< 8 pg/ml

7.1 Qualitätskontrolle

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

7.2 Typische Standardkurve

 Beispiel, bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8. Testcharakteristika

Analytische Sensitivität	3 - Methoxytyramin	
	LOD (pg/ml)	1,10
	LOQ (pg/ml)	1,95

Analytische Spezifität (Kreuzreaktion)	Substanz	Kreuzreaktion (%)
	Normetanephine	1,34
	Metanephine	<0,01
	Adrenaline	<0,01
	Noradrenaline	<0,01
	Dopamine	<0,01
	Vanillic mandelic acid	<0,01
	Homovanillic acid	<0,01
	L-DOPA	<0,01
	L-Tyrosin	<0,01
	Tyramine	0,04

Präzision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Probe	Mittelwert (pg/ml)	CV (%)	Probe	Mittelwert (pg/ml)	CV (%)
1	5,9	13,5	1	4,9	13,0
2	8,6	11,4	2	7,4	12,2
3	17,4	10,9	3	15,3	13,6
4	30,6	12,8	4	27,7	13,1

Linearität	Serielle Verdünnung bis	Mittelwert (%)	Bereich (%)
	1:64	92	81 - 96

Wiederfindung	Mittelwert (%)	Bereich (%)
	95	90 - 100

9. Referenzen/Literatur

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

△ 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> Tests
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer		