

IDK[®] Metanephrine LC-MS/MS Kit

Zur in-vitro-Bestimmung von Metanephrinen

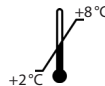
in EDTA-Plasma

For the in vitro determination of metanephrines

in EDTA plasma

Gültig ab / Valid from 2023-05-26

REF KM2200



IVD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

| | |
|--|-----------|
| 1. VERWENDUNGSZWECK | 2 |
| 2. EINLEITUNG | 2 |
| 3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN | 3 |
| 4. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN) | 4 |
| 5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN | 4 |
| <i>Kalibratoren und Kontrollen</i> | 4 |
| <i>Interner Standard</i> | 5 |
| <i>Mobile Phase (A und B)</i> | 5 |
| <i>Waschlösung 1–3</i> | 6 |
| <i>Elutionslösung</i> | 6 |
| <i>Puffer</i> | 7 |
| <i>Autosampler Waschlösung</i> | 7 |
| 6. HALTBARKEIT, STABILITÄT UND VORBEREITUNG DER PROBE | 7 |
| 7. LC-MS/MS METHODE | 8 |
| 8. MUSTERCHROMATOGRAMME | 9 |
| 9. QUALITÄTSKONTROLLE | 10 |
| <i>Referenzbereich</i> | 10 |
| 10. TESTCHARAKTERISTIKA | 10 |
| <i>Messbereich mit Quantifizierungsgrenze (LLOQ)</i> | 10 |
| <i>Wiederholbarkeit</i> | 10 |
| 11. VORSICHTSMASSNAHMEN | 11 |
| 12. ENTSÖRGUNG | 11 |
| 13. TECHNISCHE MERKMALE | 11 |
| 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 12 |
| 15. LITERATUR | 13 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Verwendungszweck dieses Kits ist die Unterstützung bei der Diagnose eines Nebennierenrindenzinoms durch Bestimmung der Konzentrationen von Metanephrin, Normetanephrin und 3-Methoxytyramin (3-MT) in EDTA-Plasma mittels automatisierter quantitativer LC-MS/MS-Assay-Technologie. Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch im Labor bestimmt.

2. EINLEITUNG

Als Metanephrine bezeichnet man Methylierungsprodukte der drei Katecholamine Epinephrin (Adrenalin), Norepinephrin (Noradrenalin) und Dopamin. Diese Katecholamine werden in der Nebenniere physiologisch produziert, um Herzschlag, Blutdruck und Glukose-konzentration zu regulieren. Sie können auch pathologisch von hormonaktiven Tumoren des sympathoadrenalen Systems, wie Phäochromozytomen, Neuroblastomen und Paragangliomen, sowie Tumoren des chromaffinen Gewebes der Nebenniere im Übermaß freigesetzt werden.

Die meisten dieser Tumore setzen Adrenalin und/oder Noradrenalin frei, jedoch produzieren einige wenige Tumore auch Dopamin. Deshalb ist es wichtig, bei Verdacht auf einen dieser Tumore alle drei Katecholamine zu bestimmen.

Allerdings gibt es bei der Bestimmung der Katecholamine die Problematik, dass etliche Tumore biochemisch nahezu inaktiv sind bzw. die Katecholamine nur periodisch absondern. Dies führt dann, in Abhängigkeit des Messzeitpunktes, eventuell zu falsch negativen Ergebnissen. Falsch positive Ergebnisse können ebenfalls auftreten; beispielsweise aufgrund von Panikstörungen oder kongestiver Herzinsuffizienz.

Ihre Metaboliten Metanephrin, Normetanephrin und 3-Methoxytyramin (3-MT) haben im Vergleich zu den Katecholaminen im Urin und im Plasma eine höhere diagnostische Sensitivität und Spezifität und werden daher für die Diagnose von Phäochromozytomen und Paragangliomen empfohlen.^[1]

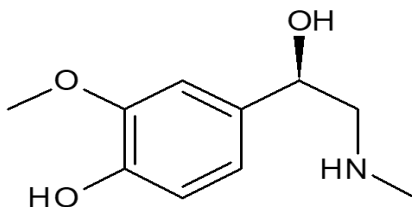


Abb. 1: Metanephrin

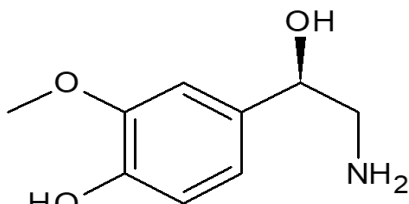


Abb. 2: Normetanephrin

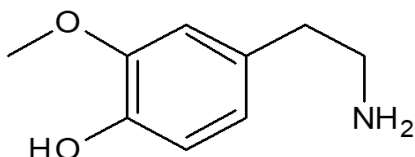


Abb 3: 3-Methoxytyramin (3-MT)

3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|----------|-------------|--|---|
| KM2200 | AUTOWASH | Autosampler Waschlösung | 1 x 1 000 ml |
| | BUF | Puffer (zur Rekonstitution von INTSTD) | 4 x 30 ml |
| | CAL1–6 | Kalibratoren 1–6, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation) | 2 Fläschchen (à 2 ml) pro Konzentration |
| | CTRL1–3 | Kontrollen 1–3, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation) | 3 Fläschchen (à 2 ml) pro Konzentration |
| | INTSTD | Interner Standard | 4 x 6 ml |
| | ELUSOL | Elutionslösung | 2 x 30 ml |
| | MOPHAA | Laufmittel A | 1 x 250 ml |
| | MOPHAB | Laufmittel B | 2 x 500 ml |
| | WASHSOL1 | Waschlösung 1 | 2 x 220 ml |
| | WASHSOL2 | Waschlösung 2 | 2 x 220 ml |
| | WASHSOL3 | Waschlösung 3 | 2 x 100 ml |

Bitte verwenden Sie für Nachbestellungen von Einzelkomponenten als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung ohne Leerzeichen.

4. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)

Folgendes Zubehör wird für die IDK® Metanephrine LC-MS/MS Applikation benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Extraktionsverteiler (z. B. Waters) oder Zentrifuge für Festphasenextraktions-säulen
- Vortex Mixer
- Standard-Labor-Einmalreaktionsgefäße aus Kunststoff (z.B. 1,5 ml)
- LC-MS/MS-Anlage und entsprechende Probenvials

Folgendes Zubehör kann separat für die IDK® Metanephrine LC-MS/MS bei der Immundiagnostik AG bestellt werden:

- 2 x 100 Festphasenextraktionssäule (KM2200COL)
- UPLC Säule (KM2200SP)
- alle Einzelkomponenten

Bitte kontaktieren Sie uns für Ihre individuelle Lösung und fordern Sie unsere Einzelkomponenten-Preisliste an.

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Hinweis: Bitte nehmen Sie die Kit-Komponenten sofort nach Erhalt aus der Transportverpackung und beachten Sie die auf den Produktetiketten aufgedruckten Hinweise zu den Lagerbedingungen.

Alle Komponenten sollten lichtgeschützt, trocken und bei der angegebenen Lagertemperatur gelagert werden. Die so gelagerten Testreagenzien sind bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar. Die angegebenen Stabilitäten gelten nur, wenn keine bakterielle Kontamination vorliegt.

Kalibratoren und Kontrollen

Handhabung:

Entfernen Sie die Kappe und den Gummistopfen stets vorsichtig (um Verluste des Inhalts zu vermeiden).

Rekonstituieren Sie die Kalibratoren und Kontrollen wie folgt:

- Rekonstituieren Sie jeden CAL und jede CTRL mit genau 2 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser und inkubieren Sie diese 15 min bei Raumtemperatur.

- Die Komponente anschließend gründlich mischen, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Trockenmaterial aufgelöst hat; dabei nicht zu stark schütteln, um Schaumbildung zu vermeiden.
- Die angesetzte Komponente während des Testverfahrens wie eine Patientenprobe handhaben.

Stabilität und Lagerung:

| | | |
|--------------------------|-------|---|
| Vor der Rekonstitution: | 2–8°C | Bis zu dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum |
| nach der Rekonstitution: | 2–8°C | 2 Wochen |
| nach der Rekonstitution: | -20°C | 1 Monat |

*Interner Standard***Handhabung:**

Entfernen Sie die Kappe und den Gummistopfen stets vorsichtig (um Verluste des Inhalts zu vermeiden).

Rekonstituieren Sie den internen Standard wie folgt:

- Rekonstituieren Sie den Inhalt eines Fläschchen INSTD mit genau 6 ml BUF und inkubieren Sie die gelöste Komponente für 15 min bei Raumtemperatur. Die verwendete Flasche BUF mit den verbleibenden 24 ml beiseite stellen.
- Die Komponente anschließend gründlich mischen, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Trockenmaterial aufgelöst hat; dabei nicht zu stark schütteln, um Schaumbildung zu vermeiden.
- Abschließend die 6 ml rekonstituierter INTSTD in die BUF-Flasche (mit den verbleibenden 24 ml) zurückgeben und gründlich mischen.

Stabilität und Lagerung:

| | | |
|--------------------------|-------|--|
| Vor der Rekonstitution: | 2–8°C | Bis zu dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum. |
| nach der Rekonstitution: | | Nach dem ersten Öffnen kann die Komponente bis zu 6 Wochen lang verwendet werden, wenn sie verschlossen und bei 2–8°C gelagert wird. |

Mobile Phase (A und B)

Handhabung:

Die Komponente ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponenten können verschlossen bis zu 6 Wochen nach dem ersten Öffnen oder bis zu 4 Wochen auf der UHPLC verwendet werden.

Lagerung bei RT Vor dem ersten Öffnen kann die Komponente für 12 Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Waschlösung 1–3

Handhabung:

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Nach dem ersten Öffnen können die Komponenten 6 Wochen lang verwendet werden, wenn sie verschlossen und bei 2–8 °C gelagert werden.

Elutionslösung

Handhabung:

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Nach dem ersten Öffnen kann die Komponente 6 Wochen lang verwendet werden, wenn sie verschlossen und bei 2–8 °C gelagert wird.

Puffer

Handhabung:

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Nach dem ersten Öffnen kann die Komponente 6 Wochen lang verwendet werden, wenn sie verschlossen und bei 2–8 °C gelagert wird.

Autosampler Waschlösung

Handhabung:

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponente kann verschlossen bis zu 6 Wochen nach dem ersten Öffnen oder bis zu 4 Wochen auf der UHPLC verwendet werden.

6. HALTBARKEIT, STABILITÄT UND VORBEREITUNG DER PROBE

Stabilität und Lagerung:

Als Probe eignet sich ausschließlich EDTA-Plasma. Wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen sind zu vermeiden.

EDTA-Plasma Proben können bis zu 3 Monate bei -20 °C gelagert werden.

Probenvorbereitung

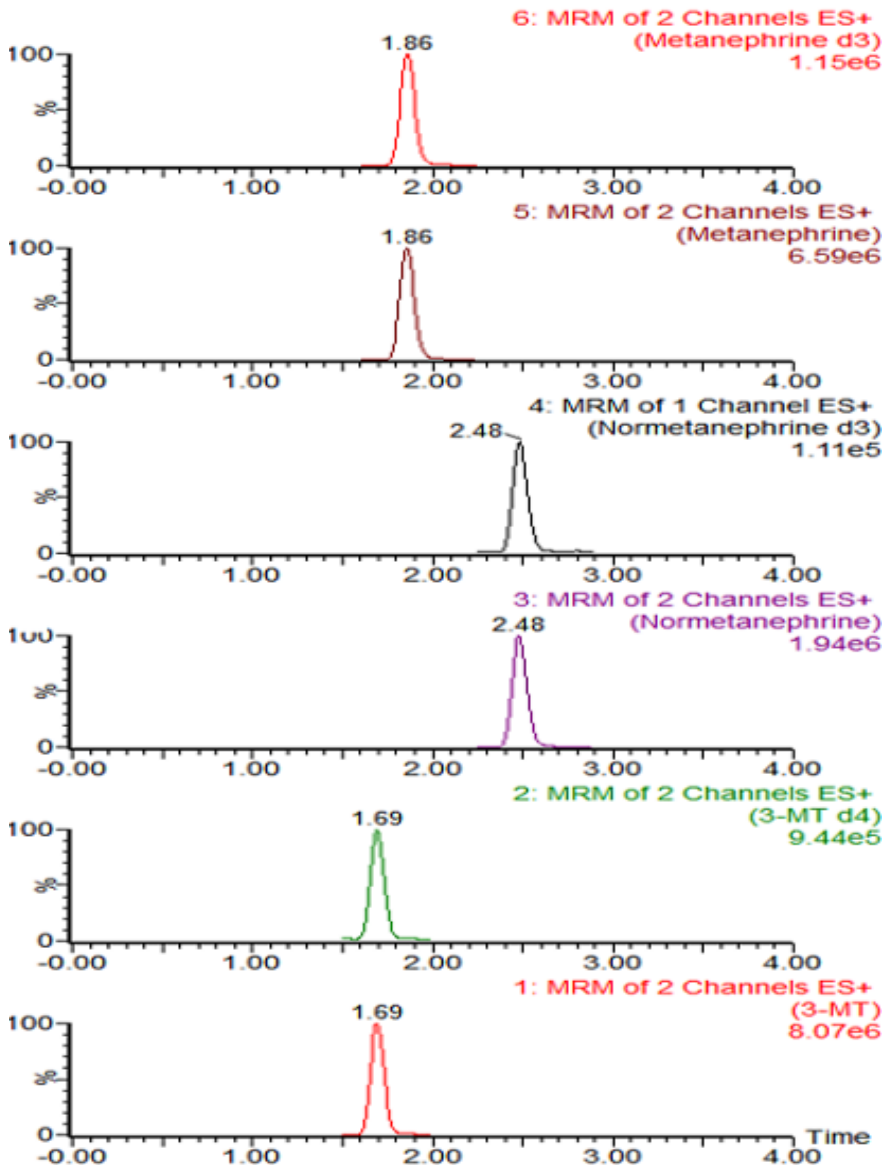
Hinweis: Die Patientenproben müssen **vor** der Zugabe von INTSTD 10 Minuten lang bei 3 000 g zentrifugiert werden. Anschließend wird der Überstand für die folgende Messung verwendet.

| | |
|-----|--|
| 1. | 500 µl Probe, CAL oder CTRL in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß geben. |
| 2. | Zugabe von 500 µl INTSTD und kurz vortexen. |
| 3. | Konditionierung der COL mit 1 ml WASHSOL1. Mit einem Extraktionsverteiler/einer Zentrifuge in ein Abfallröhrchen absaugen/zentrifugieren. Der Durchfluss wird verworfen. |
| 4. | Wiederholen Sie die Konditionierung mit 1 ml WASHSOL2. |
| 5. | 900 µl der gespikten Probe, CAL oder CTRL (aus Schritt 2.) in die COL überführen. Absaugen/zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen. |
| 6. | Erster Waschschrift mit 1 ml WASHSOL2, Absaugen/zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen. |
| 7. | Zweiter Waschschrift mit 1 ml WASHSOL1, Absaugen/zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen. |
| 8. | Dritter Waschschrift mit 1 ml WASHSOL3, Absaugen/zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen. |
| 9. | Wechseln Sie die Abfallposition bzw. das Abfallröhrchen in die Elutionsposition bzw. gegen ein neues Reaktionsgefäß. |
| 10. | Erster Elutionsschritt mit 125 µl ELUSOL. |
| 11. | Zweiter Elutionsschritt mit 125 µl ELUSOL. |
| 12. | Vortexen Sie die Elutionsfraktion für 10 s. |
| 13. | Injektion in das LC-MS/MS System (siehe Application Note). |

7. LC-MS/MS METHODE

Die Parameter zur Einstellung der LC-MS/MS-Methode entnehmen Sie bitte der Application Note oder wenden Sie sich an lcms@immundiagnostik.com.

8. MUSTERCHROMATOGRAMME



*aufgenommen mit einem Waters LC-MS/MS TQS System

9. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen werden verwendet, um die Genauigkeit der Methode zu bestätigen. Liegen einer oder mehrere Werte der Qualitätskontrolle außerhalb des angegebenen Bereiches (siehe Produktspezifikation), kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Testergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzbereich

| | |
|-----------------|--------------------------------|
| Metanephrin: | 0,07–0,33 nmol/l (14–65 ng/l) |
| Normetanephrin: | 0,23–1,07 nmol/l (42–196 ng/l) |
| 3-MT: | < 0,17 nmol (< 28 ng/l) |

Die angegebenen Referenzbereiche stammen aus der wissenschaftlichen Literatur und wurden an gesunden Personen ermittelt. Das Blut wurde in sitzender Position abgenommen.^[2]

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Messbereich mit Quantifizierungsgrenze (LLOQ)

| Analyt | nmol/l (ng/l) |
|----------------|-----------------------|
| 3-MT | 0,032–18 (5,4–3 010) |
| Metanephrin | 0,041–25 (8,1–4 931) |
| Normetanephrin | 0,093–25 (17,0–4 580) |

Wiederholbarkeit

| Analyt | Level | Konzentration [nmol/l (ng/l)] | Standard Abweichung [nmol/l (ng/l)] | Varianz (%) |
|--------|---------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------|
| 3-MT | Niedrig | 0,11 (18,4) | 0,002 (0,3) | 1,6 |
| | Hoch | 2,99 (500,0) | 0,018 (3,0) | 0,6 |
| | Patient | 0,44 (73,6) | 0,007 (1,2) | 1,6 |

| Analyt | Level | Konzentration [nmol/l (ng/l)] | Standard Abweichung [nmol/l (ng/l)] | Varianz (%) |
|----------------------|---------|----------------------------------|---|----------------|
| Meta- nephrin | Niedrig | 0,15 (29,6) | 0,003 (0,6) | 1,9 |
| | Hoch | 3,82 (753,4) | 0,034 (6,7) | 0,9 |
| | Patient | 0,29 (57,2) | 0,004 (0,8) | 1,3 |
| Normmeta- nephrin | Niedrig | 0,11 (20,2) | 0,003 (0,5) | 2,8 |
| | Hoch | 3,51 (643,0) | 0,039 (7,1) | 1,1 |
| | Patient | 1,42 (260,1) | 0,020 (3,7) | 1,4 |

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Es sind die auf den Einzelkomponenten angegebenen GHS-Symbole und Spezifikationen der Sicherheitsdatenblätter (auf Anfrage bei Immundiagnostik AG erhältlich) zu beachten. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutzvorkehrungen einzuhalten.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

12. ENTSORGUNG

Autosampler Waschlösung (AUTOWASH), Elutionslösung (ELUSOL), Laufmittel A (MOPHAA) und Laufmittel B (MOPHAB) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Die Kalibratoren (CAL1–6) und Kontrollen (CTRL1–3) sollten als potentiell infektiöses Material gemäß der örtlichen Vorschriften entsorgt werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Die Einzelkomponenten des Kits sind maximal für die angegebene Anzahl an Testdurchführungen ausgelegt. Ein bereits verwendeter Anteil der Komponenten darf nicht wiederverwendet werden.













14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.
- Sollten eine oder mehrere Komponenten des Testkits beschädigt, unvollständig (siehe Liste der Testbestandteile) oder Präzipitate in den gebrauchsfertigen Lösungen sichtbar sein, kontaktieren Sie bitte Immundiagnostik AG.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Weismann D, et al. (2015). Measurements of plasma metanephrines by immunoassay vs liquid chromatography with tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma. *European Journal of Endocrinology*, 172(3), 251-260.
2. De Jong, W.H.A., et al (2007). Plasma Free Metanephrine Measurement Using Automated Online Solid-Phase Extraction HPLC–Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 53(9), 1684-16933.

Verwendete Symbole:

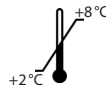
| | | | |
|---|-----------------------------------|---|--------------------------------------|
|  | Temperaturbegrenzung |  | Bestellnummer |
|  | <i>In-Vitro</i> -Diagnostikum |  | Zu verwenden mit |
|  | Hersteller |  | Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen |
|  | Chargenbezeichnung |  | Verwendbar bis |
|  | Achtung |  | Gebrauchsanweisung beachten |
|  | Spezifikationsdatenblatt beachten |  | Reizend |

IDK[®] Metanephrines LC-MS/MS Kit

*For the in vitro determination
of metanephrines in EDTA plasma*

Valid from 2023-05-26

REF **KM2200**



IVD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

| | |
|--|-----------|
| 1. INTENDED USE | 17 |
| 2. INTRODUCTION | 17 |
| 3. MATERIAL SUPPLIED | 18 |
| 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 19 |
| 5. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS | 19 |
| <i>Calibrators and controls</i> | 19 |
| <i>Internal standard</i> | 20 |
| <i>Mobile phases A and B</i> | 20 |
| <i>Wash solutions 1–3</i> | 20 |
| <i>Elution solution</i> | 21 |
| <i>Buffer</i> | 21 |
| <i>Autosampler wash solution</i> | 21 |
| 6. STORAGE, STABILITY AND PREPARATION OF SAMPLE | 21 |
| 7. LC-MS/MS PARAMETERS AND CONDITIONS | 22 |
| 8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS | 23 |
| 9. QUALITY CONTROL | 24 |
| <i>Reference range</i> | 24 |
| 10. TEST CHARACTERISTICS | 24 |
| <i>Measuring range with limit of quantification (LLOQ)</i> | 24 |
| <i>Repeatability</i> | 24 |
| 11. PRECAUTIONS | 25 |
| 12. DISPOSAL | 25 |
| 13. TECHNICAL HINTS | 25 |
| 14. GENERAL NOTES ON THE TEST | 26 |
| 15. REFERENCES | 26 |

1. INTENDED USE

The intended use of this device is assisting in diagnosis of adrenocortical carcinoma by determination of the levels of metanephrine, normetanephrine and 3-methoxytyramine (3-MT) in EDTA plasma, performed by automated quantitative LC-MS/MS assay technology. This kit is designed for laboratory professional use.

2. INTRODUCTION

Metanephrines are the methylation products of the three catecholamines epinephrine (adrenaline), norepinephrine (noradrenaline) and dopamine. These catecholamines are produced in the adrenal gland to regulate heartbeat, blood pressure and glucose homeostasis. They can also be released in excess by hormone-active tumors of the sympathoadrenal system, such as pheochromocytomas, neuroblastomas and paragangliomas, as well as tumors of the chromaffin tissue of the adrenal gland.

Most of these tumors release epinephrine and norepinephrine, but a few tumors secrete mainly dopamine. This is why all three catecholamines are important to be determined when one of these tumors is suspected.

However, there are some difficulties with determining catecholamines since some tumors, for example, are biochemically silent or only periodically secrete these catecholamines leading to false negative results. False positives may also arise because of panic disorders or congestive heart failure.

Their metabolites metanephrine, normetanephrine and 3-methoxytyramine (3-MT) have superior diagnostic sensitivity and specificity compared to urinary and plasma catecholamines and are therefore recommended for the diagnosis of pheochromocytomas and paragangliomas.^[1]

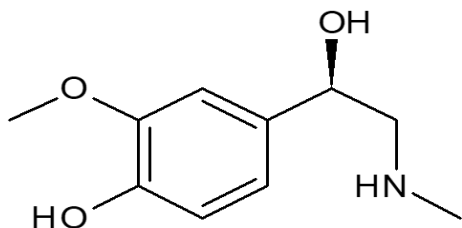


Fig 1: Metanephrine

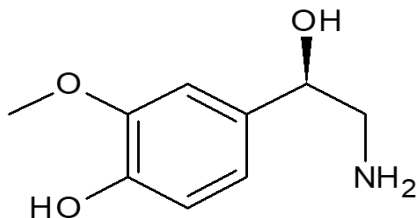


Fig 2: Normetanephrine

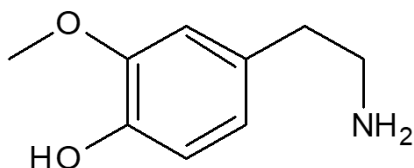


Fig 3: 3-Methoxytyramine

3. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No. | Identifier | Kit components | Quantity |
|----------|------------|--|----------------------------|
| KM2200 | AUTOWASH | Autosampler wash solution | 1 x 1 000 ml |
| | BUF | Buffer (for reconstitution of INTSTD) | 4 x 30 ml |
| | CAL1-6 | Calibrators 1-6; lyophilised (see product specification for concentration) | 2 vials (à 2 ml) per level |
| | CTRL1-3 | Controls 1-3; lyophilised (see product specification for concentration) | 3 vials (à 2 ml) per level |
| | ELUSOL | Elution solution | 2 x 30 ml |
| | INTSTD | Internal standard; lyophilised | 4 x 6 ml |
| | MOPHAA | Mobile phase A | 1 x 250 ml |
| | MOPHAB | Mobile phase B | 2 x 500 ml |
| | WASHSOL1 | Wash solution 1 | 2 x 220 ml |
| | WASHSOL2 | Wash solution 2 | 2 x 220 ml |
| | WASHSOL3 | Wash solution 3 | 2 x 100 ml |

For orders of single components, please use the catalogue number followed by the label without space as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

The following accessories are required for the IDK® Metanephrines LC-MS/MS application (not included in the kit):

- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1 000 µl
- Vortex mixer
- Extraction manifold (e.g. Waters) or centrifuge for solid phase extraction columns
- Standard laboratory disposable plastic reagent tubes (e.g. 1.5 ml)
- LC-MS/MS system and LC-MS vials

The following accessories for the IDK® Metanephrines LC-MS/MS application can be ordered separately at Immundiagnostik AG:

- 2 x 100 solid phase extraction columns (KM2200COL)
- UPLC column (KM2200SP)
- all single components

Please ask for our single component price list. Feel free to contact us for customized inquiries.

5. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Note: Please unpack the kit components from the transport packaging immediately upon receipt and follow the instructions for storage conditions printed on the product labels.

All components should be stored protected from light, dry and at their given specified storage temperature. The test reagents stored in this way are usable until the indicated expiry date. The declared stated stabilities are only valid in case of no bacterial contamination.

Calibrators and controls

Handling:

Always remove the cap and rubber plug carefully (in order to avoid loss of content).

Reconstitute the calibrators and controls as follows:

- Reconstitute each calibrator and control with exactly 2 ml distilled or deionised water and incubate for 15 min at room temperature.
- Next, mix the component thoroughly to make sure that all dry material has dissolved; do not shake too vigorously to avoid foam formation.
- Handle the prepared component as a patient sample during the test procedure.

Stability and storage:

| | | |
|------------------------|--------|---|
| Before reconstitution: | 2–8 °C | Until expiry date printed on the product label. |
| After reconstitution: | 2–8 °C | 2 weeks |
| After reconstitution: | -20 °C | 1 month |

*Internal standard***Handling:**

Always remove the cap and rubber plug carefully (in order to avoid loss of content).

Reconstitute the internal standard as follows:

- Reconstitute the content of one vial INTSTD with exactly 6 ml BUF and incubate for 15 min at room temperature. Put aside the used vial of BUF with the remaining 24 ml.
- Next, mix the component thoroughly to make sure that all dry material has dissolved; do not shake too vigorously to avoid foam formation.
- Finally, return the 6 ml reconstituted INTSTD into the BUF vial (with the remaining 24 ml) and mix thoroughly.

Stability and storage:

| | | |
|------------------------|--------|---|
| Before reconstitution: | 2–8 °C | Until expiry date printed on the product label. |
| After reconstitution: | | After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C. |

*Mobile phases A and B***Handling:**

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

| | |
|-----------------|---|
| Store at 2–8 °C | After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C or 4 weeks on the UHPLC. |
| Store at RT | Before first opening the component can be stored for 12 weeks at room temperature. |

*Wash solutions 1–3***Handling:**

The components are liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C

After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C.

*Elution solution***Handling:**

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C

After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C.

*Buffer***Handling:**

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C

After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C.

*Autosampler wash solution***Handling:**

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C

After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C or 4 weeks on the UHPLC.

6. STORAGE, STABILITY AND PREPARATION OF SAMPLE

Storage and Stability

This assay is intended for EDTA plasma samples only. Avoid freeze-thaw cycles.

Plasma samples can be stored: 3 months at -20 °C.

Sample preparation

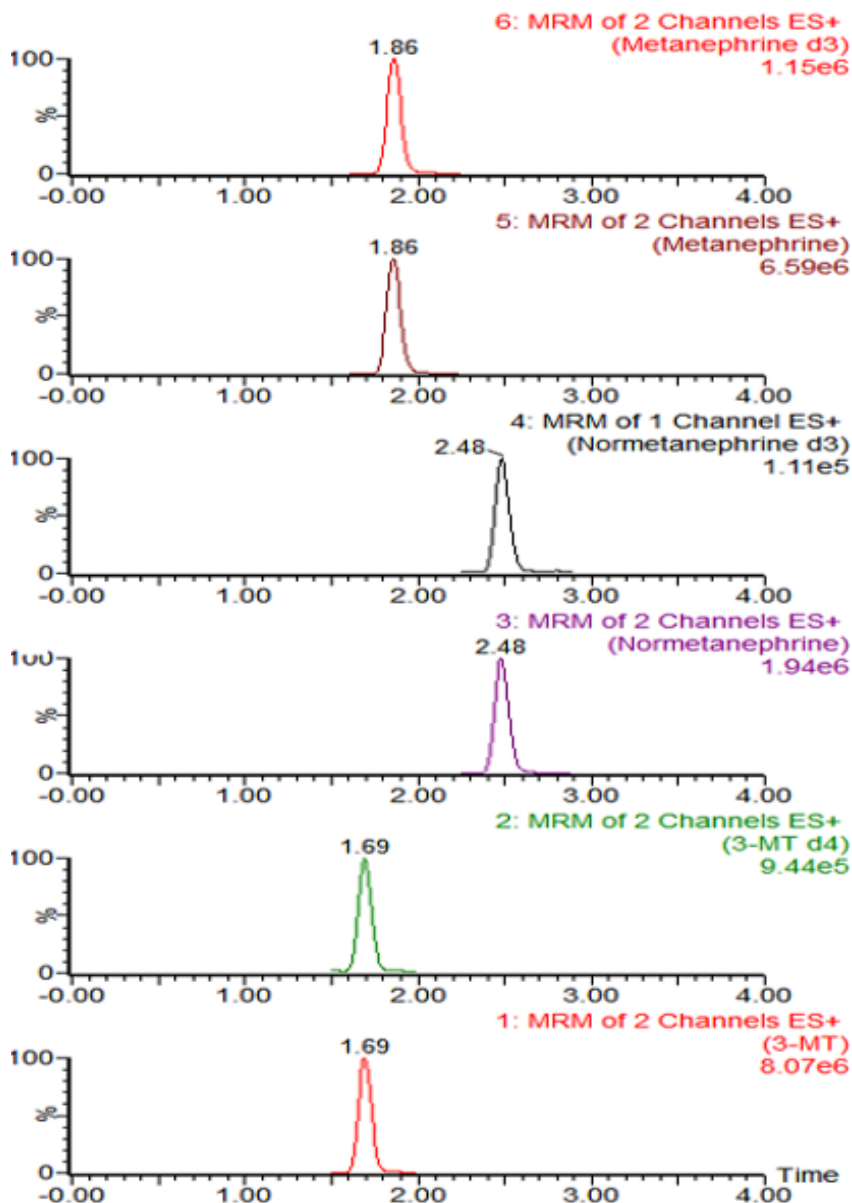
Note: The patient samples have to be centrifuged for 10 min at 3000 g prior to spiking with INTSTD. Use the supernatant for the following test procedure.

| | |
|-----|--|
| 1. | Pipet 500 µl sample, CAL or CTRL into a 1.5 ml reaction tube. |
| 2. | Add 500 µl INTSTD and vortex shortly. |
| 3. | Conditioning of the COL with 1 ml WASHSOL1. Use a extraction manifold/centrifuge to aspirate/centrifuge into a waste tube/position. Discard the flowthrough. |
| 4. | Repeat the conditioning with 1 ml WASHSOL2. |
| 5. | Transfer 900 µl of the spiked sample, CAL or CTRL (step 2.) into the COL. Aspirate/centrifuge and discard the flowthrough. |
| 6. | First wash step with 1 ml WASHSOL2, aspirate/centrifuge and discard the flowthrough. |
| 7. | Second wash step with 1 ml WASHSOL1, aspirate/centrifuge and discard the flowthrough. |
| 8. | Third wash step with 1 ml WASHSOL3, aspirate/centrifuge and discard the flowthrough. |
| 9. | Change the waste position/tube to a new receiver position/tube. |
| 10. | First elution step with 125 µl ELUSOL. |
| 11. | Second elution step with 125 µl ELUSOL. |
| 12. | Vortex the elution fraction for 10 s. |
| 13. | Inject in the LC-MS/MS (see application note). |

7. LC-MS/MS PARAMETERS AND CONDITIONS

Please refer to the application note or contact lcms@immundiagnostik.com for the LC-MS/MS method parameters.

8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS



*recorded with the Waters UHPLC I-Class and the LC-MS/MS system Xevo TQS.

9. QUALITY CONTROL

Control samples should be analysed with each run. The results of the control samples are used to confirm the accuracy of the method. The test results may not be valid, if one or more values of the quality control sample are outside the acceptable range (see product specification).

Reference range

| | |
|------------------|--------------------------------|
| Metanephrine: | 0.07–0.33 nmol/l (14–65 ng/l) |
| Normetanephrine: | 0.23–1.07 nmol/l (42–196 ng/l) |
| 3-MT: | < 0.17 nmol (< 28 ng/l) |

The indicated reference ranges are taken from scientific literature and were determined from healthy individuals. The blood was drawn in sitting position.^[2]

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

10. TEST CHARACTERISTICS

Measuring range with limit of quantification (LLOQ)

| Analyte | nmol/l (ng/l) |
|----------------|-----------------------|
| 3-MT | 0.032–18 (5.4–3 010) |
| Metanephrin | 0.041–25 (8.1–4 931) |
| Normetanephrin | 0.093–25 (17.0–4 580) |

Repeatability

| Analyte | Level | Measured value [nmol/l (ng/l)] | Standard Deviation [nmol/l (ng/l)] | CV (%) |
|---------------|---------|--------------------------------|------------------------------------|--------|
| 3-MT | Low | 0.11 (18.4) | 0.002 (0.3) | 1.6 |
| | High | 2.99 (500.0) | 0.018 (3.0) | 0.6 |
| | Patient | 0.44 (73.6) | 0.007 (1.2) | 1.6 |
| Meta-nephrine | Low | 0.15 (29.6) | 0.003 (0.6) | 1.9 |
| | High | 3.82 (753.4) | 0.034 (6.7) | 0.9 |
| | Patient | 0.29 (57.2) | 0.004 (0.8) | 1.3 |

| Analyte | Level | Measured value [nmol/l (ng/l)] | Standard Deviation [nmol/l (ng/l)] | CV (%) |
|----------------------|---------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------|
| Normeta- nephrine | Low | 0.11 (20.2) | 0.003 (0.5) | 2.8 |
| | High | 3.51 (643.0) | 0.039 (7.1) | 1.1 |
| | Patient | 1.42 (260.1) | 0.020 (3.7) | 1.4 |

11. PRECAUTIONS

- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. Still, all kit components should be treated as potentially infectious.
- The GHS symbols indicated on the individual components and specifications of the material safety data sheets (available on request from Immundiagnostik AG) must be noted. When working with these reagents, the legal protective precautions must be adhered to.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.
- The test components contain organic solvents. Avoid contact with skin or mucous membranes.

12. DISPOSAL

Autosampler wash solution (AUTOWASH), elution solution (ELUSOL) and mobile phases (MOPHAA, MOPHAB) must be disposed as nonhalogenated solvents. The calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) should be disposed as potentially infectious material in accordance with local regulations.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Plugs and caps of different reagents should not be swapped.

- The individual components of the kit are designed for a maximum of the specified number of test runs. Any part of the components that has already been used must not be reused.












14. GENERAL NOTES ON THE TEST

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.
- Please contact Immundiagnostik AG if one or more components of the kit are damaged, missing (see material supplied) or precipitates are visible in the ready-to-use solutions.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be sent to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Weismann D, et al. (2015). Measurements of plasma metanephrines by immunoassay vs liquid chromatography with tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma. *European Journal of Endocrinology*, 172(3), 251-260.
2. De Jong, W.H.A., et al (2007). Plasma Free Metanephrine Measurement Using Automated Online Solid-Phase Extraction HPLC–Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 53(9), 1684-16933.

Used symbols:

| | | | |
|---|------------------------------------|---|-----------------------------------|
|  | Temperature limitation |  | Catalogue number |
|  | In Vitro Diagnostic Medical Device |  | To be used with |
|  | Manufacturer |  | Contains sufficient for <n> tests |
|  | Lot number |  | Use by |
|  | Attention |  | Consult instructions for use |
|  | Consult specification data sheet | | |

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

