



**Messung der Plasmametaneprine mit
Immunoassay oder Tandem-Massenspektrometrie
zur Diagnose von Phäochromozytomen**

von

Anna Raida

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. S. Frantz

**Messung der Plasmametaneprine mit Immunoassay oder Tandem-
Massenspektrometrie zur Diagnose von Phäochromozytomen**

Measurements of Plasma Metanephrines by Immunoassay versus LC-MS/MS for
Diagnosis of Pheochromocytoma

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anna Raida

aus Ofterschwang

Würzburg, November 2017

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. D. Weismann

Koreferent: Prof. Dr. med. T. Wurmb

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2018

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Paragangliome und Phäochromozytome	1
1.2	Epidemiologie und Dignität	2
1.3	Variabilität der klinischen Symptomatik	2
1.4	Genetik und biochemisches Profil	3
1.5	Katecholaminmetabolismus und biochemische Diagnostik	4
1.5.1	Katecholaminmetabolismus in PPGL	4
1.5.2	Metanephrine als Standardanalyten	5
1.5.3	Präanalytische Fehlerquellen bei der Plasmametaneprinanalyse	6
1.5.4	Standardprozedur für die Blutentnahme	7
1.5.5	Messmethoden zur Plasmametaneprinanalyse	8
1.6	Aktuelle Studienlage: Plasmametaneprinanalyse mit EIA vs. LC-MS/MS	8
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Patientenkollektiv	12
2.1.1	Auswahlkriterien	12
2.1.2	Zusammensetzung des Patientenkollektivs	13
2.2	Blutentnahme unter Standardbedingungen	14
2.3	Biochemische Analysen	15
2.3.1	EIA	15
2.3.2	LC-MS/MS	17
2.4	Statistische Auswertung	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Basisauswertung	21
3.2	Negativer Bias für EIA im Vergleich zu LC-MS/MS	22
3.3	Diagnostische Testleistungen für EIA und LC-MS/MS	24
3.3.1	Geringere Sensitivität für EIA bei ähnlicher Spezifität	24
3.3.2	Vergleichbar hohe AUC in der ROC-Kurvenanalyse	25
3.3.3	Optimierung der oberen Grenzwerte des EIAs	27
3.3.4	Diagnostische Testleistung nach Optimierung der Grenzwerte	28
3.3.5	Messleistung im Graubereich	30
3.4	Biochemische Phäotypisierung der hereditären PPGL	32

3.5 Erhöhte MTY-Plasmakonzentrationen als Hinweis für Metastasen	32
4 Diskussion	33
4.1 Diagnostische Testqualitäten von Immunoassays und LC-MS/MS	33
4.1.1 Negativer Bias für EIA	33
4.1.2 ROC-Kurvenanalysen mit vergleichbarer AUC für EIA und LC-MS/MS	35
4.2 Kalibrierungsproblem des EIAs	35
4.3 Revision oberer Grenzwerte des EIAs	36
4.3.1 Validierte Grenzwerte unter Standardbedingungen	36
4.3.2 ROC-Kurven-Analyse zur Grenzwertoptimierung	37
4.3.3 Bias-Korrektur zur Grenzwertoptimierung	38
4.4 Diagnostische Testleistung bei besonderem Patientenkollektiv und im Graubereich	38
4.4.1 Patientenkollektiv mit hoher Vortestwahrscheinlichkeit	38
4.4.2 Beurteilung der Testqualität im Graubereich	39
4.5 Fehlende MTY-Analyse nachteilig für EIA	40
4.5.1 Unvollständiges biochemisches Profil	40
4.5.2 Fehlende Rückschlüsse auf Metastasen nach der biochemischen Analyse	40
4.5.3 Keine Identifizierung dopaminproduzierender Tumoren	41
4.6 Schlussfolgerungen und zukünftige Aspekte	41
5 Zusammenfassung	43
6 Literaturverzeichnis	46
Anhang	49

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
AUC	Area under the curve
CI	Confidence interval, Konfidenzintervall
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymgekoppelter Immunoassay
HPLC	High performance liquid chromatography
LC-ECD	Liquid chromatography with electrochemical detection
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Tandemmassenspektrometrie
LDN	Labor Diagnostika Nord
LR ⁻	Negative Likelihood Ratio
LR ⁺	Positive Likelihood Ratio
MAO	Monoaminoxidase
MEN2	Multiple endokrine Neoplasien Typ 2
MN	Metanephrin
MTY	Methoxytyramin
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NMN	Normetanephrin
NPV	Negative predictive value, Negativer Vorhersagewert
PMT-Studie	Prospective monoamine-producing tumor study
PPGL	Phäochromozytom und Paragangliom
PPV	Positive predictive value, Positiver Vorhersagewert
Q1	Quadrupol 1
Q3	Quadrupol 3
RET	Rearranged during transfection
RIA	Radioimmunoassay
ROC	Receiver operating characteristic
SDHB	Succinatdehydrogenase B
SDHx	Succinatdehydrogenase A-D
SPE	Solid phase extraction

SULT 1A3	Sulfotransferase
TMB	Tetramethylbenzidin
UC	Upper cut-off, Oberer Grenzwert
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
VHL	Von-Hippel-Lindau
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Die biochemische Diagnostik von Phäochromozytomen und Paragangliomen (PPGL) basiert auf einem tumorbedingt gesteigerten Katecholaminmetabolismus. Der Nachweis von erhöhten Katecholaminkonzentrationen stellt hohe Anforderungen an die biochemische Analytik: Katecholamine sowie deren Metabolite sind kleine Moleküle und liegen im Plasma nur in geringen Konzentrationen vor. Bereits mäßig erhöhte Konzentrationen können pathologisch sein. Nicht oder spät diagnostizierte PPGL bergen das Risiko für lebensbedrohliche Komplikationen [1, 2]. Folglich sind präzise biochemische Nachweisverfahren und validierte Messmethoden unerlässlich, um PPGL frühzeitig sicher zu diagnostizieren. Diese Studie hat das Ziel einen weit verbreiteten enzymgekoppelten Immunoassay (EIA) und eine Flüssigkeitschromatographie mit Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) bezüglich ihrer diagnostischen Testleistung bei der Plasmametanephrinanalyse direkt miteinander zu vergleichen.

1.1 Paragangliome und Phäochromozytome

Die World Health Organization (WHO) klassifizierte im Jahr 2004 Phäochromozytome und Paragangliome als neuroendokrine Tumoren, die von chromaffinen Zellen ausgehen und die Fähigkeit besitzen, Katecholamine zu produzieren.

Paragangliome entwickeln sich aus extraadrenalen Ganglien. Sie können sowohl hormonaktiv als auch hormoninaktiv sein. In Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Thyrosinhydroxylase, der DOPA-Decarboxylase und der Dopamin-beta-Hydroxylase können Paragangliome Dopamin und Noradrenalin produzieren [3, 4].

Bei 80-85% der PPGL handelt es sich um Phäochromozytome [5, 6]. Sie entstehen aus chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks. Phäochromozytomen ist es aufgrund ihrer zusätzlichen enzymatischen Ausstattung mit der Phenylethanolamin-N-Methyltransferase möglich Noradrenalin in Adrenalin

umzuwandeln. Infolgedessen können Phäochromozytome sowohl Adrenalin als auch Noradrenalin und Dopamin produzieren [4, 7].

1.2 Epidemiologie und Dignität

Eindeutige Daten zur Inzidenz und Prävalenz von PPGL liegen nicht vor. Es handelt sich um seltene Tumoren. Schätzungen gehen von einer jährlichen Inzidenz zwischen zwei und fünf Fällen pro eine Million Einwohner aus [8, 9]. Autopsiestudien lassen vermuten, dass die Prävalenz höher liegen könnte und eine relevante Anzahl der PPGL zu Lebzeiten der Patienten nicht diagnostiziert wird [10-12].

Die überwiegende Anzahl der PPGL ist benigne. 10-15% der Phäochromozytome metastasieren jedoch im Verlauf. Bei den Paragangliomen werden 15-35% maligne Tumoren beschrieben [8, 13]. Prädisponierend für Malignität sind neben der extraadrenalen Lage, eine Tumorausdehnung von mehr als fünf Zentimeter Durchmesser sowie das Vorliegen einer Succinatdehydrogenase B (SDHB)-Mutation [14]. Ebenfalls können erhöhte Plasmakonzentrationen an Methoxytyramin (MTY), dem O-methylierten Abbauprodukt von Dopamin, ein Hinweis auf Malignität sein [7].

1.3 Variabilität der klinischen Symptomatik

Die klinischen Symptome sind durch eine autonome Überproduktion von Katecholaminen verursacht und zeigen sich variabel aufgrund der unterschiedlichen endokrinen Aktivität der Tumoren [4, 15, 16]: Bis zu ein Viertel der Patienten mit PPGL sind klinisch asymptomatisch [17]. Mantero et al. (2000) stellten fest, dass dies häufig Patienten mit Inzidentalomen und kleinen Tumoren betreffe [18].

Symptome wie Kopfschmerzen, Palpitationen, Schwitzen, intermittierender oder persistierender Hypertonus, Blässe, Müdigkeit, Übelkeit, Gewichtsverlust und psychische Symptome wie Angst- und Panikattacken sind hinweisend für PPGL [5]. Da diese Symptome bei Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt sein können

und auch bei anderen Erkrankungen auftreten, führt dies zu verspäteten Diagnosen.

Im Extremfall verursachen PPGL durch eine massive Katecholaminsekretion katecholaminergen Krisen. Hierfür sind Provokationsfaktoren wie Medikamente (Glukokortikoide, trizyklische Antidepressiva, Metoclopramid et cetera), die Tumormanipulation im Rahmen von Operationen sowie Anästhesieverfahren bekannt [1].

1.4 Genetik und biochemisches Profil

Die Mehrzahl der PPGL treten sporadisch auf. Bei bis zu 35% kann aktuell eine genetische Ursache nachgewiesen werden [8, 17, 19, 20]. In Tabelle 1 sind die häufigsten Gene in Zusammenhang mit familiären Syndromen aufgeführt [17].

Tabelle 1: Hereditäre Formen der PPGL

Syndrom	Häufigkeit	Gen	Biochemischer Phänotyp	Malignität
Von-Hippel-Lindau	13%	VHL	Noradrenalin	5%
Multiple endokrine Neoplasie Typ 2	5%	RET	<u>Adrenalin</u> +Noradrenalin	3%
Neurofibromatose Typ 1	4%	NF1	<u>Adrenalin</u> +Noradrenalin	11%
Familiäre Paragangliom-Syndrome	6%	SDHB	Noradrenalin+Dopamin	50%
	4%	SDHD	Noradrenalin+Dopamin	<3%

VHL: Von-Hippel-Lindau, RET: Rearranged during transfection, NF1: Neurofibromatose Typ 1
SDHB/D: Succinatdehydrogenase B/D [5, 13, 21]

Patienten mit hereditären PPGL stellen in besonderem Maße eine Herausforderung für die biochemische Diagnostik dar, da sie im Vergleich zu Patienten mit sporadischen Formen häufig nur gering erhöhte Hormonkonzentrationen aufweisen [22]. Es wird vermutet, dass dies der Korrelation zwischen Katecholaminproduktion und Tumorgröße geschuldet sei [4]. Durch regelmäßige Screening-Untersuchungen an asymptomatischen Patienten mit familiärer Prädisposition, wird versucht PPGL in besonders frühen Stadien zu diagnostizieren.

Das biochemische Profil eines hereditären Tumors gibt Hinweise auf die zugrunde liegende Mutation. Der biochemische Phänotyp ist von der enzymatischen Ausstattung und der Enzymaktivität der Tumoren abhängig. Dieser wird durch die sezernierten Hormone und deren Verhältnis zueinander determiniert. Wenn Adrenalin und dessen Abbauprodukt Metanephrin (MN) dominieren, spricht dies bei hereditären Formen in 99% der Fälle für Mutationen im NF1- oder RET-Gen [23]. Wenn Noradrenalin und dessen Abbauprodukt Normetanephrin (NMN) überwiegen, sind Mutationen in VHL- oder SDHx-Genen (Succinatdehydrogenase Typ A-D) wahrscheinlicher. Diese wiederum können durch den Nachweis von MTY in 78% der Fälle voneinander unterschieden werden, da bei SDHx- Mutationen häufiger ein zusätzlich gesteigerter Dopaminmetabolismus nachgewiesen wird [23].

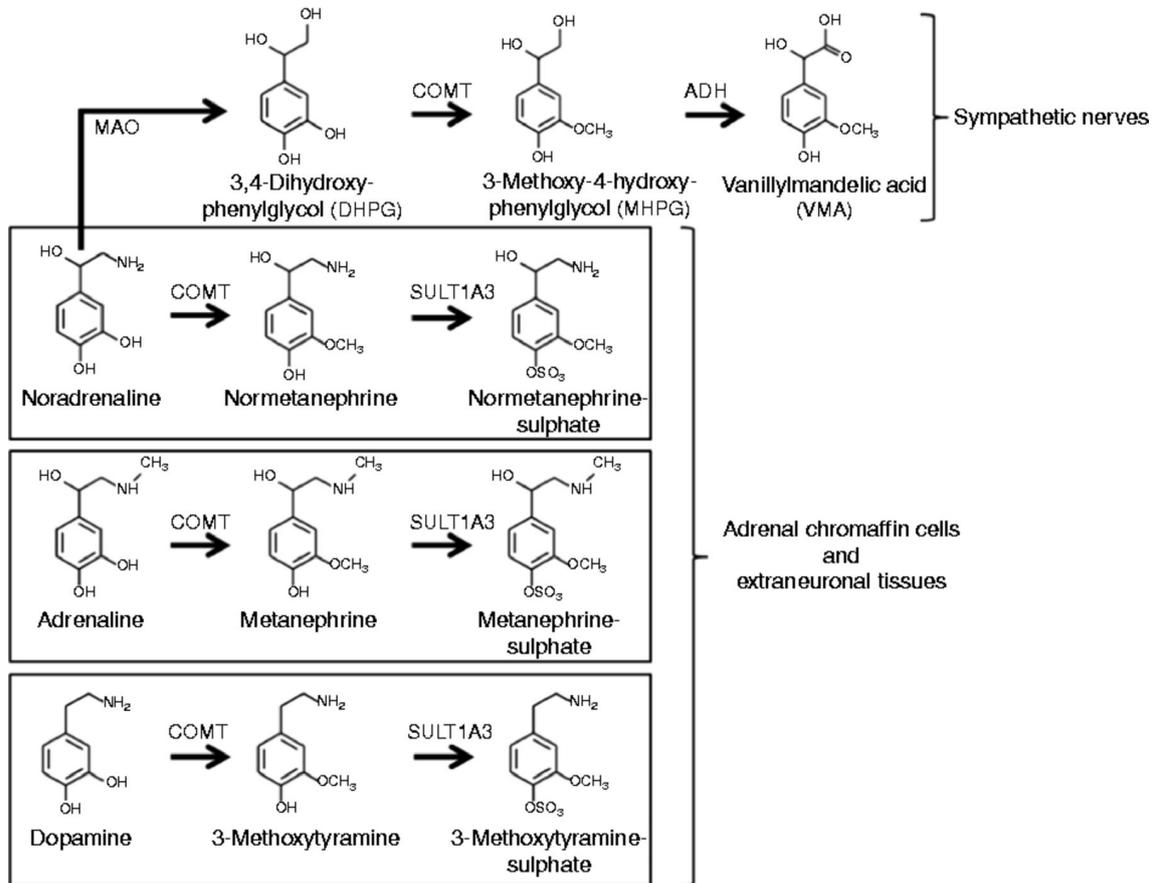
1.5 Katecholaminmetabolismus und biochemische Diagnostik

Der biochemischen Diagnostik liegt ein gesteigerter Katecholaminmetabolismus in PPGL zugrunde. Die Sekretion der synthetisierten Katecholamine aus Speichervesikeln erfolgt in Tumorzellen autonom, intermittierend und zum Teil überschießend.

1.5.1 Katecholaminmetabolismus in PPGL

Die O-Methylierung ist der entscheidende Schritt in der Metabolisierung von Katecholaminen in Tumorzellen [16]. Durch Leckagen der Speichervesikel gelangen Katecholamine kontinuierlich in das Zytoplasma und werden dort durch das Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT) beständig methyliert. Dabei entsteht aus Dopamin MTY, aus Noradrenalin NMN sowie aus Adrenalin MN (siehe Abbildung 1). Diese Abbauprodukte gelangen dann als freie Plasmametaneprine in das Blut. Für die renale Ausscheidung werden sie durch die Sulfotransferase 1A3 (SULT 1A3) in Sulfatkonjugate umgewandelt.

Abbildung 1: Katecholaminmetabolismus in chromaffinen Zellen und sympathischen Nervenendigungen [24]



COMT: Catechol-O-Methyltransferase, SULT1A3: Sulfotransferase 1A3, MAO: Monoaminoxidase, ADH: Alkoholdehydrogenase

1.5.2 Metanephrine als Standardanalyten

Im Vergleich zu den Messungen der Katecholamine weisen die Analysen der Metanephrine eine höhere Sensitivität und Spezifität auf [22, 25-27]. Die Sensitivität für die Bestimmung der Plasmametaneprine liegt nach aktuellen Angaben bei 96-100% und die Spezifität bei 80-100% [24]. Auch die Messungen der Metanephrine im 24h-Sammelurin waren denen der Katecholamine im 24h-Sammelurin überlegen [22]. Damit gelten die Analysen der Plasmamethanephrine sowie der Metanephrine im 24h-Sammelurin als Methoden der ersten Wahl in der biochemischen Diagnostik der PPGL [22, 28].

Ursächlich für die höhere Sensitivität ist unter anderem, die kontinuierliche Freisetzung von Metanephrinen, wohingegen Katecholamine intermittierend sezerniert werden [16, 29-31]. Ferner gibt es PPGL ohne Katecholaminsekretion, die jedoch Metanephrine metabolisieren [16]. Dementsprechend können normwertige Plasmakatecholaminspiegel bei asekretorischen Tumoren und in einem Intervall zwischen zwei Episoden autonomer Katecholaminsekretion vorliegen.

Bezüglich der niedrigeren Spezifität von Katecholaminmessungen wird postuliert, dass eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems eine Erhöhung des Noradrenalinspiegels durch vermehrte Noradrenalinsekretion verursachen kann [16]. Plasmametaneprinspiegel sind von einer Sympathikusaktivierung geringer betroffen, da in sympathischen Nervenendigungen nicht der Abbauweg über die O-Methylierung zu NMN dominiert. Vielmehr entstehen hier über das Schlüsselenzym Monoaminoxidase (MAO) 3,4-Dihydroxyphenylglycol, 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol und Homovanillinmandelsäure als Noradrenalinabbauprodukte (siehe Abbildung 1) [32].

1.5.3 Präanalytische Fehlerquellen bei der Plasmametaneprinanalyse

Falsch positive Messresultate stellen ein häufiges Problem bei der biochemischen Diagnostik der PPGL dar [22, 33]. Sie können Verunsicherungen der Patienten, zeitintensive Bestätigungstests und kostenintensive radiologischen Verfahren nach sich ziehen. Folgende präanalytische Fehlerquellen führen zu erhöhten Hormonspiegeln:

Einige Medikamente interferieren pharmakodynamisch mit dem Katecholaminmetabolismus. Hervorzuheben sind vor allem Phenoxybenzamin und trizyklische Antidepressiva, die in einer Studie von Eisenhofer et al. (2003) für bis zu 45% der falsch positiven Messergebnisse verantwortlich gemacht wurden [33]. Des Weiteren sind auch medikamentenassoziierte Interaktionen mit einzelnen Messmethoden bekannt. Aufgrund ähnlicher Retentionszeiten wurde eine Interferenz von Paracetamol mit der NMN-Analyse mittels

Flüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion (LC-ECD: liquid chromatography with electrochemical detection) nachgewiesen [34].

Katecholamin- und Metanephrinkonzentrationen können ebenfalls durch Nahrungs- und Genussmittel wie Koffein oder Nikotin erhöht sein. Um diese Fehlerquelle für falsch positive Messergebnisse zu vermeiden, ist die Blutentnahme bei nüchternen Patienten empfohlen [22, 35].

Eine aufrechte Körperposition trägt dazu bei, dass die Sympathikusaktivität und damit die Katecholaminsekretion zur Blutdruckregulation gesteigert werden. Lenders et al. (2007) zeigten, dass es zu einem dreifachen Anstieg der falsch positiven Resultate kam, wenn die Blutentnahme an sitzenden Patienten erfolgte [36]. Därr et al. (2014) bestätigten die Bedeutung von Nüchternheit und aufrechter Körperposition erneut als Fehlerquellen und demonstrierten einen fünffachen Anstieg der falsch positiven Testergebnisse [37]. Sie folgerten, dass die Referenzintervalle nach oben korrigiert werden müssten, wenn die Blutentnahmen nicht unter Standardbedingungen erfolgten, um die falsch positiv Rate zu reduzieren [37]. Dies würde aber eine deutliche Einschränkung der Sensitivität bewirken. Aufgrund der Seltenheit der Tumoren ist jedoch eine hohe Sensitivität für eine zuverlässige Diagnostik unerlässlich.

1.5.4 Standardprozedur für die Blutentnahme

Zur Minimierung präanalytischer Fehlerquellen wurden von Därr et al. (2014) folgende Voraussetzungen für die Blutentnahme zu Plasmametanephrinanalyse determiniert: Die Patienten mussten zwölf Stunden nüchtern sein und durften keine koffeinhaltigen oder entkoffeinierte Getränke zu sich nehmen. Zur Vermeidung einer erhöhten Sympathikusaktivität ruhten die Patienten vor der Blutentnahme 20-30 Minuten in Rückenlage [37].

Des Weiteren sollten, wenn klinisch vertretbar, interferierende Medikamente temporär abgesetzt werden [33].

Falls diese Standardprozedur nicht durchführbar ist, müssen präanalytische Fehlerquellen bei der Beurteilung eines positiven Testresultates bedacht und die

Messung gegebenenfalls unter Berücksichtigung der genannten Bedingungen wiederholt werden [24, 37].

1.5.5 Messmethoden zur Plasmametaneprinanalyse

Für die Plasmametaneprinanalyse stehen aktuell chromatographische Verfahren kombiniert mit verschiedenen Detektionsmethoden und immunologische Verfahren zur Verfügung [34, 38-41].

Eine präferierte und häufig verwendete Methode ist die Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Tandemmassenspektrometrie LC-MS/MS [42, 43]. Die Flüssigkeitschromatographie ist eine physikalische Trennmethode zur Auftrennung eines Stoffgemisches in seine Einzelbestandteile. Es lassen sich substanzspezifische Retentionszeiten ermitteln. Für die Identifizierung und Quantifizierung wird eine Tandemmassenspektrometrie als Detektionsverfahren nachgeschaltet. Es gibt einige Studien, die LC-MS/MS als präzises, sensitives und hoch selektives Messverfahren in der biochemischen Diagnostik der PPGL beschreiben [38, 39, 42-45].

In Europa sind Immunoassays zur Messung von Plasmametaneprinen weit verbreitet. Immunoassays basieren auf dem Nachweis von substanzspezifischen Antikörper-Antigen-Interaktionen. Diese können durch gekoppelte Enzyme in nachfolgenden Reaktionen photometrisch (EIA) oder durch gebundene radioaktive Marker mit Hilfe eines Gammacounters detektiert werden (RIA).

1.6 Aktuelle Studienlage: Plasmametaneprinanalyse mit EIA vs. LC-MS/MS

Zur Messung der Plasmametaneprine sind kommerziell sowohl ein Radioimmunoassay (RIA) als auch ein enzymgebundener Immunoassay (EIA) verfügbar. In einigen Studien wurde die diagnostische Testleistung von Immunoassays untersucht und diese als geeignete Messverfahren zur Metaneprinanalyse befunden [26, 46-50]. In Tabelle 2 sind Ergebnisse der einzelnen Studien bezüglich der Sensitivitäten und der Spezifitäten gegenübergestellt.

Tabelle 2: Sensitivitäten und Spezifitäten der Metanephrinanalyse mit Immunoassays [26, 46-50]

	RIA		EIA			
	Unger (2006)	Pussard (2014)	Gao (2008)	Procopiou (2009)	Christensen (2011)	Sarathi (2011)
Sensitivität	96%	100%	97%	92%	91%	94%
Spezifität	79%	95%	86%	100%	99%	94%

In der multizentrische Studie von Lenz et al. (2006) wurden die Messverfahren RIA und LC-MS/MS miteinander verglichen. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation der Ergebnisse beider Messmethoden bei übereinstimmend hoher Präzision [41].

Es gibt jedoch Hinweise, dass Immunoassays im Vergleich zu LC-MS/MS die tatsächliche Konzentration der Metanephrine unterschätzen, sodass die Befürchtung besteht, dass PPGL aufgrund falsch negativer Messergebnisse nicht diagnostiziert würden [45, 51-53]:

- In einem Artikel von Pillai und Callen (2010) über die Ergebnisse eines Qualitätsbewertungsprogramms bezüglich der Plasmametaneprinenanalyse verschiedener Messmethoden wurde von einer größeren Ungenauigkeit und einem negativen Bias bei EIAs im Vergleich zu LC-MS/MS berichtet [52].
- Eine retrospektive Studie von Peaston et al. (2010) wies einen negativen Bias von 25% für einen EIA im Vergleich zu LC-MS/MS nach. Dadurch wurden zwei von 38 Patienten mit PPGL nicht korrekt identifiziert, was zu einer Sensitivität von 95% für den EIA verglichen mit 100% für LC-MS/MS führte. Die Spezifität beider Messmethoden waren nahezu gleichwertig [45].
- Im Jahr 2012 kamen Mullins et al. zu dem Resultat, dass EIA für die biochemische Phäochromozytomdiagnostik von Erwachsenen nicht ideal sei. Hier zeigte sich ein negativer Bias von 32% für die NMN-Messung durch den EIA im Vergleich zu der Referenzmethode LC-MS/MS. Dies berge das Potential Patienten mit PPGL aufgrund falsch negativer Messergebnisse

nicht zu diagnostizieren. Die Sensitivität beider Methoden war dennoch 100%, sodass beide Verfahren alle 13 Patienten mit histologisch bestätigtem PPGL richtig identifizierten. Die Spezifität unterschied sich mit 88,3% für den EIA und 95% für LC-MS/MS [53].

Aufgrund dieser diskrepanten Datenlage ist aktuell keine eindeutige Aussage möglich, ob die Messverfahren Immunoassay und LC-MS/MS für die Plasmametanephrinanalyse in gleichem Maße geeignet sind.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Nachweis eines gesteigerten Katecholaminstoffwechsels ist grundlegend für die biochemische Diagnostik der PPGL. Während Einigkeit darüber besteht, dass Metanephrine als Standardanalyten gelten, bestehen widersprüchliche Angaben bezüglich der Gleichwertigkeit verwendeter Messverfahren.

Metanephrinmessungen stellen hohe Anforderungen an die biochemische Analytik: Metanephrine sind kleine Moleküle und liegen im Plasma nur in Nanomol-pro-Liter- Konzentrationen vor. Bereits mäßig erhöhte Konzentrationen können pathologisch sein. Demzufolge ist es von großem Interesse präzise Messverfahren zu besitzen.

Diese Studie vergleicht einen EIA mit LC-MS/MS bezüglich der Plasmametaneprinanalyse direkt miteinander. Dabei ergeben sich folgende Hypothesen:

1. Die Messverfahren EIA und LC-MS/MS, unterscheiden sich nicht bezüglich der diagnostischen Testqualität. Die Sensitivität und Spezifität sind gleich.
2. Die bisher festgelegten oberen Grenzwerte sind adäquat gewählt und gewährleisten eine sichere Differenzierung zwischen Patienten mit und ohne PPGL.

2 Material und Methoden

Alle Daten wurden im Zeitraum von September 2010 bis Februar 2013 im Rahmen der „Prospective Monoamine-Producing Tumor study“ (PMT-Studie) erhoben. Dabei handelte es sich um eine prospektive Studie, die von der Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Dresden koordiniert und in mehreren europäischen Zentren in einem Zeitraum von fünf Jahren durchgeführt wurde. Die Blutproben für die Untersuchungen dieser Substudie stammen aus den fünf Zentren Dresden, Düsseldorf, München, Warschau und Würzburg. Die Durchführung der Studie wurde von den jeweiligen Ethikkommissionen genehmigt (EK 104/11).

2.1 Patientenkollektiv

Die Zusammensetzung des Patientenkollektivs dieser Substudie erfolgte anhand unten genannter Ein- und Ausschlusskriterien. Die Kriterien entsprachen denen der PMT-Studie.

2.1.1 Auswahlkriterien

Es wurden Patienten eingeschlossen, bei denen der begründete Verdacht auf ein PPGL bestand oder eine zugrunde liegende Überproduktion von Monoaminen auszuschließen war. Die Patientenauswahl erfolgte anhand der, in Tabelle 3 aufgelisteten Einschlusskriterien.

Tabelle 3: Einschlusskriterien für die Studienteilnahme

Einschlusskriterien
1. Klinisch begründeter Verdacht für ein PPGL basierend auf typischen Symptomen
2. Hypertensive Entgleisung oder therapierefraktärer Hypertonus (definiert als Blutdruck von $\geq 140/90$ mmHg trotz Behandlung mit \geq drei Antihypertensiva in Höchstdosis, darunter ein Diuretikum)
3. Hereditäres Syndrom (bekannte Mutation oder positive Familienanamnese)
4. PPGL- Nachsorge
5. Inzidentalom

Es wurden nur Patienten ausgewählt, die mindestens ein Einschlusskriterium erfüllten und kein in Tabelle 4 aufgeführtes Ausschlusskriterium aufwiesen.

Tabelle 4: Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme

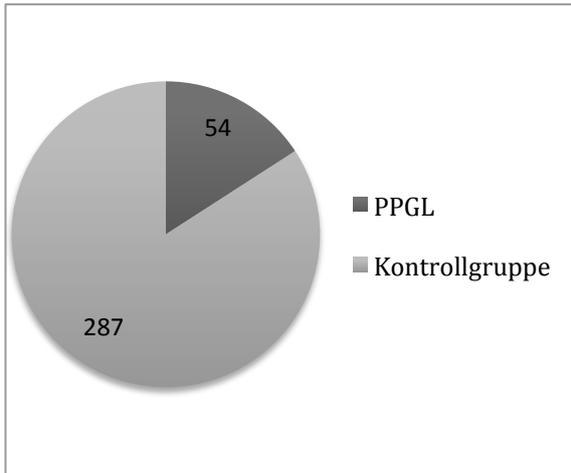
Ausschlusskriterien
1. Eingeschränkte mentale Leistungs- und Urteilsfähigkeit
2. Trizyklische Antidepressiva als Dauermedikation

2.1.2 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Unter diesen Voraussetzungen konnten 341 Patienten, davon 174 Männer und 167 Frauen eingeschlossen werden. Bei 54 Patienten wurden PPGL diagnostiziert. (siehe Abbildung 2). Die Diagnose wurde entweder durch histologisch-pathologische Gewebeuntersuchungen der resezierten Tumoren bestätigt oder es wurde bei inoperablen Tumoren der Nachweis von Metastasen in bildgebenden Verfahren zur Bestätigung der Diagnose herangezogen. Bei 15 Patienten mit PPGL war eine Genmutation bekannt oder wurde bestätigt (siehe Abbildung 3). Sechs Patienten wiesen eine Succinatdehydrogenase D-Mutation auf. Bei einem Patienten lag eine SDHB-Mutation zugrunde. Bei drei Patienten war eine VHL-Mutation ursächlich. Zwei Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 und drei Patienten mit Multiple endokrine Neoplasien Typ 2 (MEN)- Syndrom hatten ein Phäochromozytom. 17 Patienten wurden negativ für bekannte prädisponierende genetische Mutationen getestet und bei 22 Patienten lagen keine weiteren Informationen zu einer zugrundeliegenden Genmutation vor.

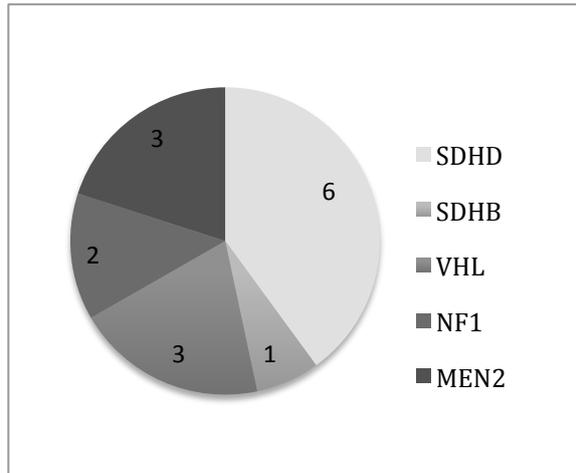
Bei 287 Patienten wurde ein PPGL entweder durch Bestätigung anderer krankheitsursächlicher Diagnosen, Remission der initialen Symptome oder einer unauffälligen zwölfmonatigen Nachuntersuchungsperiode ausgeschlossen.

Abbildung 2: Patientenkollektiv Σ 341



54 Patienten mit PPGL
287 Patienten ohne PPGL=Kontrollgruppe

Abbildung 3: Hereditäre PPGL Σ 15



6 SDHD, 1 SDHB, 3 VHL, 2 NF1, 3 MEN2

2.2 Blutentnahme unter Standardbedingungen

Die Blutentnahme erfolgte nach der, in Kapitel 1.5.4 beschriebenen Standardprozedur. Die definierten Voraussetzungen an die Patienten sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Bedingungen für die standardisierte Blutentnahme

Seit dem Vorabend der Blutentnahme	<ul style="list-style-type: none"> • Nüchtern • Kein Nikotin • Keine koffeinhaltigen, entkoffeinierten oder alkoholischen Getränke
Ab 5 Tagen vor der Blutentnahme	<ul style="list-style-type: none"> • Kein Paracetamol

Zudem mussten alle Patienten vor der Blutentnahme 30 Minuten in Rückenlage ruhen. Es wurden allen Patienten zwei 7,5ml Lithium Heparin Sarstedt Monovetten® venöses Vollblut entnommen und sofort mit Eis gekühlt. Nach dem gekühlten Transport in das Labor wurden die Monovetten fünf Minuten bei 4000U/min und 5°C zentrifugiert. Das Plasma wurde aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren. Davon wurde jeweils eine gefrorene Probe für die LC-MS/MS-Analyse

nach Dresden und eine für die EIA-Messung zu Labor Diagnostika Nord GmbH und Co.KG (LDN) nach Nordhorn geschickt.

2.3 Biochemische Analysen

Die Messungen erfolgten verblindet ohne jegliche klinische Information zu den Proben und ohne Kenntnis über zuvor durchgeführte biochemische Analysen.

2.3.1 EIA

Die Plasmametaneprinanalyse mittels EIA wurde beim Hersteller LDN in Nordhorn durchgeführt. Ein immunologischer Nachweis von MTY stand zum Zeitpunkt der Studiendurchführung nicht zur Verfügung.

Validierung des Immunoassays mit Heparinplasma

Laut Herstellerangaben ist dieser EIA für die Verwendung von Ethylendiamintetraacetat (EDTA)- oder Citratplasma konzipiert. Da die Proben dieser Studie aber heparinisiertes Plasma enthielten, musste zunächst das Verfahren hierfür validiert werden. Die Metanephrikkonzentrationen in 16 Paaren von EDTA-antikoaguliertem und heparinisiertem Plasma aus Nebennierenvenenblut wurden mit dem EIA gemessen und miteinander verglichen. Die Blutproben von Nebennierenkathereruntersuchungen wurden von dem endokrinen Zentrum des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Es zeigte sich eine enge Korrelation zwischen EDTA- und heparinisiertem Plasma sowohl bei NMN ($r^2 = 0,975$, $p < 0,001$) als auch bei den MN ($r^2 = 0,916$, $p < 0,001$). Dies lies die Schlussfolgerung zu, dass heparinisiertes Plasma ebenfalls eine geeignete Probenmatrix für diesen EIA darstellte und damit bei den nachfolgenden Messungen keine starken Matrixeffekte zu erwarten waren.

Die Durchführung der Plasmasametanephrikanalyse mit dem EIA der Firma LDN fand entsprechend der veröffentlichten Gebrauchsanweisung zu den kommerziell erhältlichen Kits statt (siehe Anhang): Zunächst wurde die Proteinmatrix der Plasmaproben durch Präzipitationsreagenzien entfernt. Im Anschluss wurde eine Acetylierung durchgeführt, um suffiziente immunogene Strukturen für die folgende Antikörper-Antigen-Reaktion zu generieren. Danach wurde das MN-

Antiserum bzw. das NMN-Antiserum hinzugegeben und für 20 Stunden bei 2-8°C inkubiert. Die Metanephrene der Patientenprobe, der Standards sowie der Kontrollen konkurrierten mit dem gebundenen Antigen um eine fixe Anzahl der Anti-Serum-Bindestellen. Nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichts wurden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörper-Komplexe abgewaschen.

Der, an die feste Phase gebundene, Antikörper-Antigen-Komplex wurde im nächsten Schritt durch eine enzymatische Reaktion nachgewiesen. Dazu wurde ein Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, der mit dem Enzym Peroxidase konjugiert war, in alle Vertiefungen pipettiert, für 30 Minuten inkubiert und danach abgewaschen. Anschließend wurde Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugefügt und erneut für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit einer 0,25M Schwefelsäure (H₂SO₄) –Lösung gestoppt. Abschließend wurde die Absorption der Lösungen bei 450nm und Referenzwellenlängen zwischen 620nm und 650nm photometrisch gemessen.

Dem Assay liegt ein kompetitives Prinzip zu Grunde. Grundsätzlich gilt: Je höher die Konzentration der Metanephrene im Patientenserum ist, desto geringer fällt die nachweisbare Reaktion aus. Es besteht somit indirekte Proportionalität. Die Quantifizierung erfolgte durch einen Abgleich von standardisierten Kalibrierungskurven. Die Kalibrierungskurven wurden generiert, indem die berechneten Mittelwerte der Absorption der Standards linear auf der Ordinatenachse eines Koordinatensystems gegen die korrespondierenden bekannten Standardkonzentrationen logarithmisch auf der Abszissenachse graphisch dargestellt wurden.

Laut Herstellerangaben betrage die Nachweisgrenze für NMN 23pg/ml (0,126nmol/l) und 17pg/ml (0,086nmol/l) für MN. Ferner gibt der Hersteller obere Grenzwerte (upper cut-off: UC) für NMN von 180pg/ml (0,98nmol/l) und für MN von 90pg/ml (0,46nmol/l) an.

Angaben zur Reproduzierbarkeit und Präzision des EIA werden vom Hersteller in der Gebrauchsanweisung wie folgt veröffentlicht: Der Intra-Assay-Variationskoeffizient für NMN betrage zwischen 7,2%-7,8%, für MN zwischen 7,3-

11,0% und der Inter-Assay-Variationskoeffizient liege für NMN zwischen 5,1%-11%, für MN zwischen 8,9 - 10%.

2.3.2 LC-MS/MS

Die Analyse der Plasmametaneprine mittels LC-MS/MS wurde im Institut für Klinische Chemie und Labormedizin der Universitätsklinik Dresden durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht die Analyse von NMN, MN und MTY. Die verwendeten Geräte waren ein Acquity Ultra-Performance-Flüssigkeitschromatographie-System (UPLC) von Waters Corporation gekoppelt an ein AB SCIEX QTRAP 5500 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer. Die Probenvorbereitung wurde mit einem Positive-Pressure-96-Processor mit einer Festphasenextraktion (SPE) auf OASIS® MCX-96-well Mikrotiterplatten durchgeführt. Peitzsch et al. (2013) beschreiben die Validierung der genannten LC-MS/MS-Methode der Universitätsklinik Dresden [43]. Die Angaben zu den Materialien und der Durchführung wurden hier in Anlehnung an jene Studie übernommen:

Zunächst erfolgte die Probenvorbereitung durch eine Festphasenextraktion (SPE). Hierfür werden 96-well Mikrotiterplatten sequentiell mit Methanol, destilliertem Wasser und Ammoniumacetatpuffer gefüllt und unter positiven Druck von 60-80psi durch das SPE-Material gepumpt. Danach wurden Ammoniumacetatpuffer, interne Standardlösungen (Konzentrationen zwischen 2,5-3,0nmol/l) und die Plasmaproben in die Vertiefungen gefüllt und durch die feste Phase gepumpt. Das SPE-Material wurde anschließend mit wässriger Ameisensäure und Methanol gewaschen. Verbliebene Analyten und zurückgehaltene interne Standards wurden durch Elution mittels zweier Durchläufe mit ammoniakalischem Methanol vom Sorbens entfernt und in tiefe Mikrotiterplatten gefüllt. Im Anschluss fand eine Verdampfung der Lösungsmittel in einem zentrifugierenden Vakuumkonzentrator (Savant SC210A Speedvac Concentrator, ThermoFisher Scientific) statt. Verbleibende Rückstände wurden in jeder Vertiefung in Acetonitril und Ameisensäure gelöst.

Kalibratoren (hergestellt aus Verdünnungen von Arbeitsstandards in Acetonitril und Ameisensäure) und die SPE-gereinigten Proben wurden bei einer Flussrate von 0,53ml/min in die UPLC-Säule injiziert.

Als Detektionsverfahren wurde eine Tandemmassenspektrometrie nachgeschaltet. Die Analyten wurden in die Gasphase überführt und ionisiert. Hierfür wurde ein Elektrospray-Ionisierungs-Interface benutzt, Hochspannung angelegt und unter Atmosphärendruck ein Ionenstrahl generiert. Der Ionenstrahl wird mit Hilfe einer elektrischen Beschleunigungsspannung in den Massenanalysator geleitet und nach dessen substanzspezifischen Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt. Der Massenanalysator enthält den elektrischen Quadrupol Q1, der durch seine Filterfunktion nur den ionisierten Analyten zu der nachgeschalteten Kollisionszelle durchlässt. In dieser Stoßzelle zerfällt der Analyt durch das Zusammenstoßen mit Stickstoffmolekülen in spezifische Fragmentationen. Diese werden in einem weiteren Massenanalysator erneut nach deren Masse-zu-Ladungsverhältnissen aufgetrennt. Das darin enthaltene letzte Quadrupol Q3 dient dazu, dass nur Fragmentationen mit dem größten Signal-Rausch-Verhältnis Signale am Detektor verursachen. Mit Hilfe des Detektors werden die einfallenden Ionen mit ihrem substanzspezifischen Zerfallsmuster in ein Massenspektrum konvertiert. Dies wird graphisch durch das Auftragen des Masse-zu-Ladungsverhältnisses gegen die relativen Signalintensitäten dargestellt.

Die Identifizierung und Quantifizierung gelingt durch standardisierte Kalibrierungskurven. Für NMN, MN und MTY sind in Tabelle 6 die typischen Zerfallsreihen dargestellt.

Tabelle 6: Zerfallsreihe für NMN, MN, MTY anhand der substanzspezifischen Masse-zu-Ladungsverhältnisse

Analyt	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)
NMN	166	134
MN	180	165
MTY	151	91

NMN: Normetanephrin, MN: Metanephrin, MTY: Methoxytyramin, Q1: Quadrupol 1, Q3: Quadrupol 3, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis [43]

Der Intra-Assay-Variationskoeffizient wird in der oben genannten Studie für NMN zwischen 3,7%-4,9%, für MN zwischen 5,9%-13,5% und für MTY zwischen 2,9%-5,6% angegeben. Der Inter-Assay-Variationskoeffizient wird für NMN mit 7,9%-8,4%, für MN mit 6,7%-11,7% und für MTY mit 7,8%-11,4% beschrieben. Als Nachweisgrenzen werden für NMN 4,4pg/ml (0,024nmol/l), für MN 3,9pg/ml (0,020nmol/l) und für MTY 4,0pg/ml (0,024nmol/l) determiniert [43].

In einer Studie von Eisenhofer et al. (2013) wurden die oberen Grenzwerte (upper cut-off: UC) mittels LC-ECD neu validiert [54]. Für MN wurde 88pg/ml (0,45nmol/l) und für MTY 30pg/ml (0,18nmol/l) als oberer Grenzwert festgesetzt. Bei NMN zeigte sich eine signifikante Korrelation mit dem Alter. Demzufolge wurden die oberen Grenzwerte für NMN altersabhängig nach der Formel $UC_{NMN} = (3,792 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Alter}^3) + 98,9$ aus einer Regressionsanalyse berechnet. Damit ergab sich ein UC_{NMN} von 99pg/ml (0,54nmol/l) für fünfjährige Patienten und ein maximaler UC_{NMN} von 200pg/ml (1,09nmol/l) für Patienten ≥ 65 Jahre [54].

Eine Gegenüberstellung der Nachweisgrenzen sowie der oberen Grenzwerte beider Messverfahren ist in Tabelle 7 zusammengestellt. MTY ging in den direkten Vergleich beider Messverfahren nicht mit ein, da ein EIA zur Messung von MTY zum Zeitpunkt der Studiendurchführung kommerziell nicht erhältlich war.

Tabelle 7: Nachweisgrenzen und Obere Grenzwerte für EIA und LC-MS/MS

	EIA	LC-MS/MS
Nachweisgrenzen	NMN: 23pg/ml (0,126nmol/l) MN: 17pg/ml (0,086nmol/l)	NMN: 4,4pg/ml (0,024nmol/l) MN: 3,9pg/ml (0,020nmol/l) MTY: 4,0pg/ml (0,024nmol/l)
Obere Grenzwerte	NMN: 180pg/ml (0,98nmol/l) MN: 90pg/ml (0,46nmol/l)	NMN: altersabhängig* MN: 88pg/ml (0,45nmol/l) MTY: 30pg/ml (0,18nmol/l)

* altersabhängige Grenzwerte nach der Formel $UC_{NMN} = (3,792 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Alter}^3) + 98,9$
99pg/ml (0,54nmol/l) - 200pg/ml (1,09nmol/l) bei 5 Jährigen - ≥ 65 Jährigen

2.4 Statistische Auswertung

Als negative Resultate wurden Messungen definiert, bei denen sowohl die Konzentrationen für NMN als auch die für MN unterhalb der oberen Grenzwerte lagen. Der Test war korrekt negativ, wenn ein Patient ohne PPGL ein negatives Messergebnis aufwies. Falsch negativ waren alle Ergebnisse, bei denen ein Patient mit PPGL negativ getestet wurde. Ein positives Messergebnis wurde dadurch definiert, dass mindestens ein oberer Grenzwert, entweder der für MN oder der für NMN überschritten wurde. Als richtig positiv wurden dementsprechend Resultate für Patienten mit PPGL und positivem Messergebnis definiert. Falsch positiv waren definitionsgemäß positive Messresultate bei Patienten ohne PPGL.

Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test zur Überprüfung der Signifikanz verwendet. Konfidenzintervalle wurden durch die Methode von Newcombe berechnet. P-Werte von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant determiniert und durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet. Unterschiede in der diagnostischen Sensitivität und Spezifität wurden mit dem McNemar's Test verglichen. Der Bias des Immunoassays wurde durch eine Bland-Altman-Analyse quantifiziert. Die oberen Grenzwerte des Immunoassays wurden nachbestimmt: Zum einen durch eine Berechnung unter der Berücksichtigung des Bias, zum anderen durch eine receiver operating characteristic (ROC)-Kurven-Analyse. Die ROC-Kurven-Analyse diente neben der Grenzwertoptimierung auch der Berechnung der area under the curve (AUC) nach der Methode von Hanley-und McNeil als Qualitätsmaß für die diagnostische Testleistung [55].

Die Durchführung der statistischen Analysen wurde mit dem Programm R® Version 2.12.2 vorgenommen.

3 Ergebnisse

Unter den 341 eingeschlossenen Patienten waren 174 (51%) Männer und 167 (49%) Frauen. Bei 54 (16%) Patienten wurde ein PPGL diagnostiziert, bei 287 (84%) Patienten ausgeschlossen. Im Folgenden kommen die Resultate des Vergleichs der beiden Messmethoden EIA und LC-MS/MS bezüglich der Plasmametanephrinanalyse zur Darstellung.

3.1 Basisauswertung

Bei den EIA-Messungen zeigte sich für Patienten mit PPGL ein Median von 224pg/ml für NMN. Dieser war signifikant ($p < 0,001$) höher als der Median von 32pg/ml bei NMN-Messungen von Patienten ohne PPGL. Auch für die Messungen mit LC-MS/MS wurde ein signifikant ($p < 0,001$) höherer Median für NMN von 499pg/ml für Patienten mit PPGL im Vergleich zu dem Median von 58pg/ml für Patienten ohne PPGL berechnet.

Genauso zeigten die Messungen von MN signifikant ($p < 0,001$) höhere Mediane für Patienten mit PPGL im Vergleich zu Patienten ohne PPGL bei beiden Messmethoden. Bei MN- Messungen mit dem EIA betrug der Median für Patienten mit PPGL 39pg/ml im Vergleich zu 16pg/ml bei Patienten ohne PPGL. Der Median für MN, gemessen von LC-MS/MS, war für Patienten mit PPGL mit 79pg/ml signifikant ($p < 0,001$) höher als der Median von 36pg/ml für Patienten ohne PPGL. Die Basisauswertung ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Basisauswertung und mediane Plasmametaneprinkonzentrationen gemessen mit EIA und LC-MS/MS

	PPGL bestätigt	Kein PPGL	p-Wert
n	54	287	
Alter	51,5 (20-82)	54,0 (13-86)	0,54
Geschlecht (w/m)	26/28	141/146	1
EIA			
NMN (pg/ml)	224 (30-2907)	32 (22-100)	<0,001
MN (pg/ml)	39 (16-976)	16 (15-157)	<0,001
LC-MS/MS			
NMN (pg/ml)	499 (48-9067)	58 (15-167)	<0,001
MN (pg/ml)	79 (13-2833)	36 (3-85)	<0,001

Werte als Mediane angegeben (Verteilung), P-Werte mit Mann-Whitney-U-Test berechnet

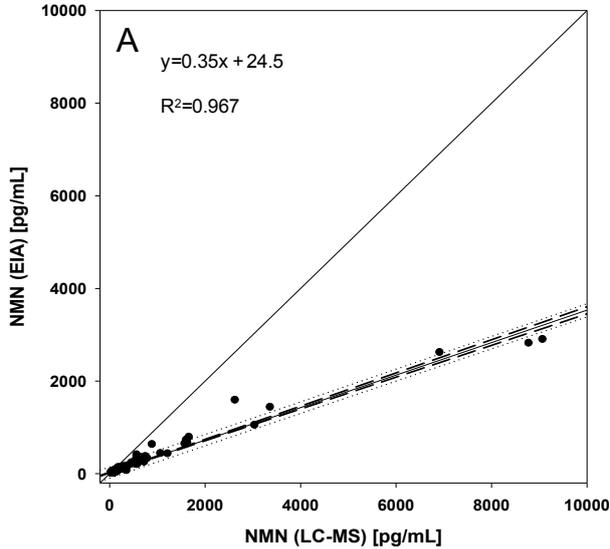
3.2 Negativer Bias für EIA im Vergleich zu LC-MS/MS

Bei den Messungen mit EIA waren 75 Proben unterhalb der Nachweisgrenze für NMN (<23pg/ml) und 170 Proben unterhalb der Nachweisgrenze für MN (<17pg/ml). Diese Resultate gingen nicht in die Bland-Altman Analyse ein.

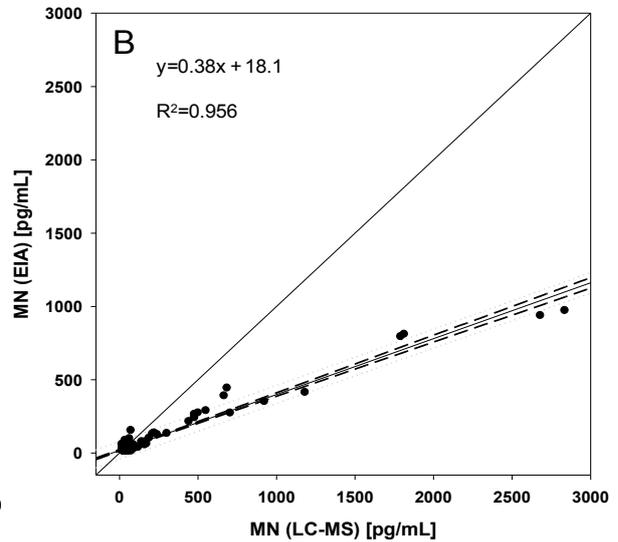
Zwar korrelierten die Messwerte von EIA und LC MS/MS eng miteinander, jedoch waren die des EIAs erheblich niedriger. Der negative Bias wurde durch die Bland-Altman-Analyse mit 60% für NMN und 39% für MN quantifiziert. Dieser negative Bias war bei Patienten mit höheren Plasmametaneprinkonzentrationen deutlicher ausgeprägt als bei niedrigeren Konzentrationen. Im hohen Konzentrationsbereich bei Patienten mit PPGL war der negative Bias für NMN 74% und für MN 52% mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$. Im niedrigen Konzentrationsbereich bei Patienten ohne PPGL war der negative Bias für NMN 56% und für MN 35% mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,025$ (siehe Abbildung 4, Abbildung 5).

Abbildung 4: Regressionsanalyse für Plasmametaneprinkonzentrationen mit EIA und LC-MS/MS

A) NMN



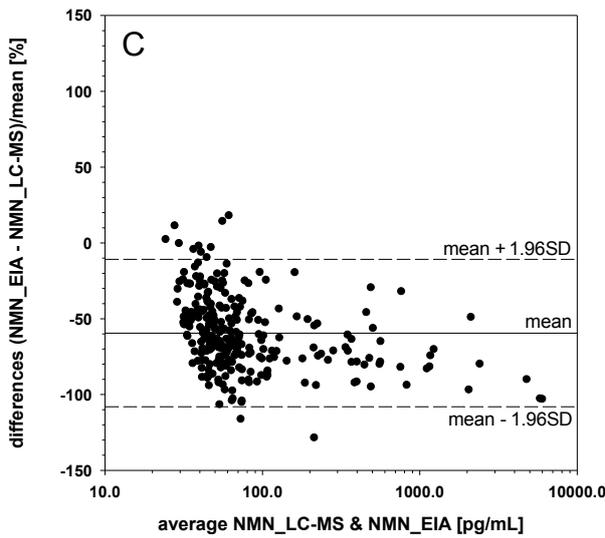
B) MN



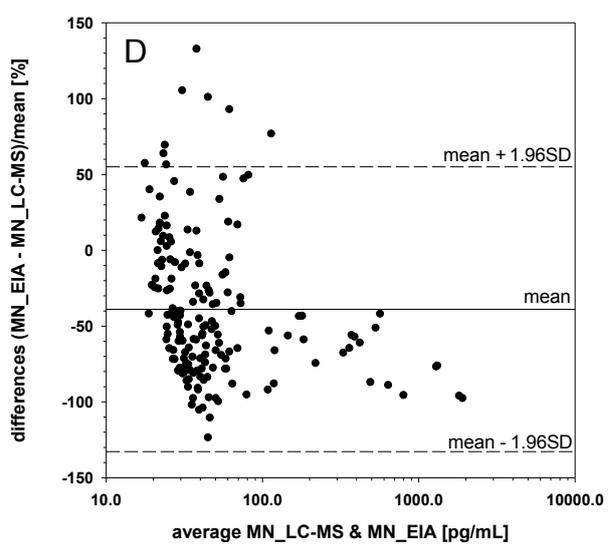
Ordinate: Plasmametaneprinkonzentrationen gemessen mit EIA
Abszisse: Plasmametaneprinkonzentrationen gemessen mit LC-MS/MS

Abbildung 5: Prozentuale Unterschiede der Plasmametaneprinkonzentrationen mit EIA und LC-MS/MS - Bland-Altman-Plot

C) NMN



D) MN



Ordinate: Differenzen der Messwerte EIA- der Messwerte LC-MS/MS im Verhältnis zum Mittelwert in Prozent
Abszisse: Mittelwert der Messwerte von LC-MS/MS und EIA

3.3 Diagnostische Testleistungen für EIA und LC-MS/MS

Die diagnostische Testleistungen für EIA und LC-MS/MS wurden durch die Berechnungen der Sensitivität und Spezifität sowie durch die ROC-Kurvenanalysen ermittelt und miteinander verglichen. Ferner wurden Grenzwertoptimierungen durchgeführt und die Testleistung beider Messverfahren bei nur gering erhöhten Messresultaten gesondert betrachtet.

3.3.1 Geringere Sensitivität für EIA bei ähnlicher Spezifität

Unter Verwendung der oberen Grenzwerte nach Herstellerangaben betrug die diagnostische Sensitivität für den EIA 74,1% (CI; 61,0-83,9) und war damit erheblich niedriger als die Sensitivität von 98,1% (CI; 90,2-99,7) für LC MS/MS bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$. Dies führte zu 14 (25,9%) falsch negativen Testergebnissen gemessen mit EIA im Vergleich zu nur einem falsch negativen Testergebnis gemessen mit LC-MS/MS. Dieser Patient hatte ein Dopamin produzierendes Paragangliom mit Knochenmetastasen. Durch eine zusätzliche MTY-Messung mittels LC-MS/MS wurde dieser Patient korrekt positiv getestet und damit eine Sensitivität von 100% (CI; 93,4-100) erreicht.

Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Spezifitäten nur unwesentlich. Für den EIA betrug sie 98,9% (CI; 97,0-99,6). Für LC-MS/MS ergab sich eine Spezifität von 99,7% (CI; 98,0-99,9) ohne MTY-Messung und eine Spezifität von 98,6% (CI; 96,5-99,5) mit MTY-Messung.

Veranschaulicht sind die Sensitivitäten und Spezifitäten der beiden Messmethoden in Tabelle 9.

Tabelle 9: Sensitivitäten und Spezifitäten von LC-MS/MS und EIA

	EIA	LC-MS/MS ohne MTY	LC-MS/MS mit MTY
Obere Grenzwerte	NMN 180pg/ml** MN 90pg/ml	NMN 99-200pg/ml* MN 88pg/ml	NMN 99-200pg/ml* MN 88pg/ml MTY 30pg/ml
Sensitivität	74,1%	98,1%	100%
Konfidenzintervall	(CI; 61,0-83,9)	(CI; 90,2-99,7)	(CI; 93,4-100)
Detektionsrate	(40/54)	(53/54)	(54/54)
Spezifität	98,9%	99,7%	98,6%
Konfidenzintervall	(CI; 97,0-99,6)	(CI; 98,0-99,9)	(CI; 96,5-99,5)
Detektionsrate	(284/287)	(286/287)	(283/287)

* altersabhängige Grenzwerte nach der Formel $UC_{NMN} = (3,792 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Alter}^3) + 98,9$

** Herstellerangabe

3.3.2 Vergleichbar hohe AUC in der ROC-Kurvenanalyse

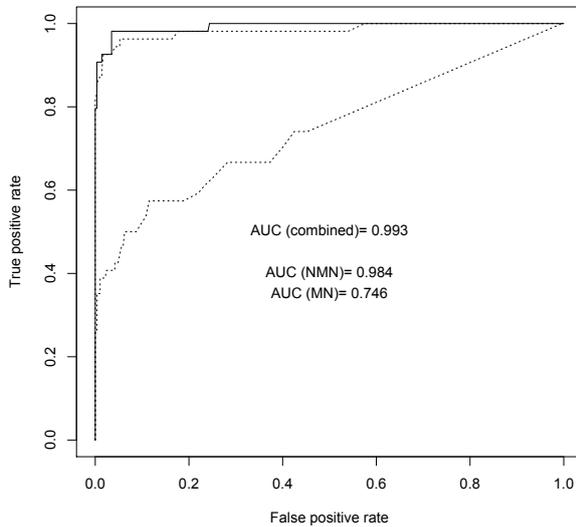
Die ROC-Kurven-Analyse zeigte, dass sich die berechneten AUCs beider Messverfahren trotz der signifikant niedrigeren Sensitivität des EIAs nicht wesentlich unterscheiden.

Für den EIA wurde eine AUC für NMN von 0,984, für MN von 0,747 bestimmt und für die Kombination aus beiden eine AUC von 0,993 berechnet.

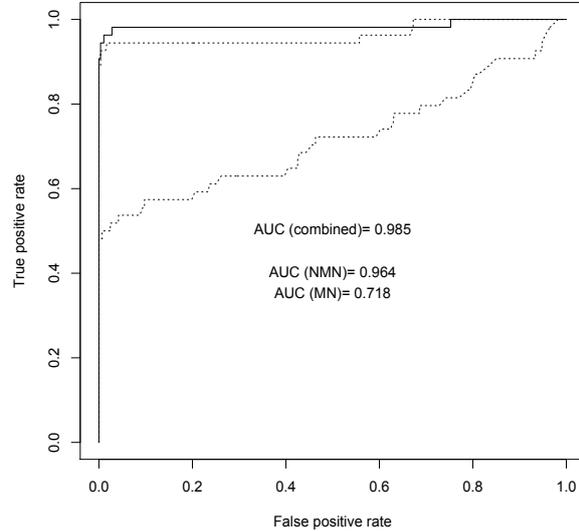
Vergleichbare Werte wurden für Messungen mit LC-MS/MS erhoben. Hierbei war die AUC der NMN 0,964, die AUC der MN 0,718 und die AUC der konstruierten Kombination 0,985. Für MTY ergab sich eine AUC von 0,847. In der kombinierten Betrachtung von NMN, MN, MTY lag die AUC bei 1 (siehe Abbildung 6).

Abbildung 6: ROC-Kurven für Plasmametanephrinmessungen mit EIA und LC-MS/MS

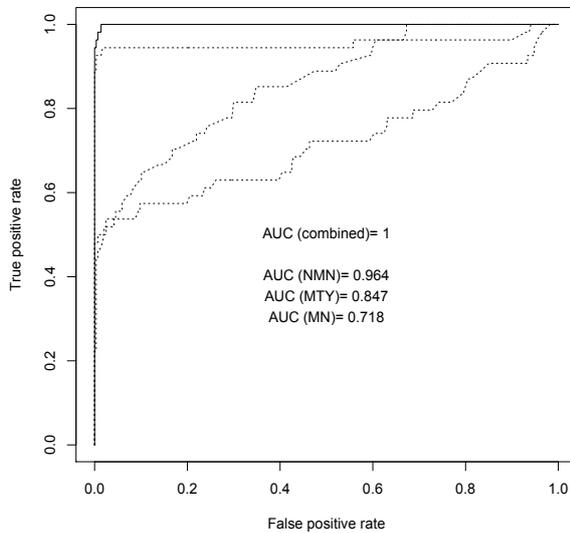
A) EIA



B) LC-MS/MS ohne MTY



C) LC-MS/MS mit MTY



Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass beide Messmethoden eine vergleichbar hohe diagnostische Testleistung besitzen. Dies deutete darauf hin, dass die schwächere diagnostische Sensitivität des EIAs auf inadäquate obere Grenzwerte zurückzuführen war.

3.3.3 Optimierung der oberen Grenzwerte des EIAs

Für die Korrektur der oberen Grenzwerte wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt.

Zunächst wurden die Grenzwerte unter Berücksichtigung des negativen Bias berechnet. Bei einem negativen Bias von 35% ergab sich für MN ein neuer oberer Grenzwert von 58pg/ml (0,294nmol/l). Die oberen Grenzwerte für NMN wurden unter Berücksichtigung des negativen Bias von 56% altersabhängig angeglichen. Hierzu ergab sich die Formel $UC_{NMN} = (1,668 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Alter}^3) + 43,5$. Damit wurden obere Grenzwerte für NMN von 44pg/ml (0,24nmol/l) für fünfjährige Patienten bis zu 88pg/ml (0,48nmol/l) bei 65-jährigen und älteren Patienten determiniert.

Mit diesen Anpassungen vergrößerte sich die diagnostische Sensitivität auf 96,2% (CI; 87,5-99,0) mit einem geringen Verlust der Spezifität auf 95,1% (CI; 92,0-97,1).

Ferner wurden die oberen Grenzwerte durch eine ROC-Kurven-Analyse neu berechnet. Hierbei ergaben sich Werte von 31pg/ml für MN und 74pg/ml für NMN. Dies resultierte in einer diagnostischen Sensitivität von 98,1% (CI; 90,0-99,7) sowie einer Spezifität von 87,5% (CI; 83,1-90,8) (Siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Sensitivität und Spezifität des EIAs in Abhängigkeit der oberen Grenzwerte

	Herstellerangaben	Bias-korrigiert	ROC-Kurven-Analyse
Obere Grenzwerte	NMN 180pg/ml MN 90pg/ml	NMN 44-88pg/ml* MN 58pg/ml	NMN 74pg/ml MN 31pg/ml
Sensitivität	74,1%	96,2%	98,1%
Konfidenzintervall	(CI; 61,0-83,9)	(CI; 87,5-99,0)	(CI; 90,0-99,7)
Detektionsrate	(40/54)	(52/54)	(53/54)
Spezifität	98,9%	95,1%	87,5%
Konfidenzintervall	(CI;97,0-99,6)	(CI; 92,0-97,1)	(CI; 83,1-90,8)
Detektionsrate	(284/287)	(273/287)	(251/287)

* altersabhängige Grenzwerte nach der Formel $UC_{NMN} = (1,668 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Alter}^3) + 43,5$

3.3.4 Diagnostische Testleistung nach Optimierung der Grenzwerte

Beide Methoden zur Grenzwertoptimierung trugen dazu bei, die diagnostische Sensitivität des EIAs und LC-MS/MS auf ein vergleichbares Niveau anzuheben.

Bezüglich der resultierenden Spezifität unterschieden sich die beiden Grenzwertoptimierungsmethoden jedoch voneinander. Die Bias-Korrektur der Grenzwerte führte zu einer Spezifität von 95,1% (CI; 92,0-97,1), wohingegen die Verwendung der, nach der ROC-Kurvenanalyse berechneten oberen Grenzwerte, eine geringere Spezifität von 87,5% (CI; 83,1-90,8) ergab.

Zusammenfassend ist hervorzuheben, dass durch die Bias-korrigierten oberen Grenzwerte des EIAs die diagnostische Testleistung vergleichbar mit der von LC-MS/MS wurde. Die Sensitivität des EIAs war mit 96,2% (KCI; 87,5-99,0) um 1,9% niedriger als die Sensitivität von 98,1% (CI; 90,2-99,7) für LC-MS/MS. Die Spezifität des EIAs mit 95,1% (CI; 92,0-97,1) war um 4,6% geringer als die Spezifität von LC-MS/MS mit 99,7% (CI; 98,0-99,9) (Siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Sensitivität und Spezifität von LC-MS/MS und EIA nach Bias-Korrektur

	EIA	LC-MS/MS (ohne MTY)
Obere Grenzwerte	NMN 44-88pg/ml* MN 58pg/ml	NMN 99-200pg/ml** MN 88pg/ml
Sensitivität	96,2%	98,1%
Konfidenzintervall	(CI; 87,5-99,0)	(CI; 90,2-99,7)
Detektionsrate	(52/54)	(53/54)
Spezifität	95,1%	99,7%
Konfidenzintervall	(CI; 92,0-97,1)	(CI:98,0-99,9)
Detektionsrate	(273/287)	(286/287)

Bias- korrigierte obere Grenzwerte des EIA, LC-MS/MS ohne MTY-Messung

* altersabhängige Grenzwerte nach der Formel $UC_{NMN} = (1,668 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Alter}^3) + 43,5$

** altersabhängige Grenzwerte nach der Formel $UC_{NMN} = (3,792 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Alter}^3) + 98,9$

Zur Beurteilung der Aussagekraft der Messresultate wurden die prädiktiven Werte sowie die Likelihood Ratio für beide Messmethoden berechnet und in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Prädiktive Vorhersagewerte und Likelihood Ratio

	EIA		LC-MS/MS	
Obere Grenzwerte	NMN 44-88pg/ml*		NMN 99-200pg/ml**	
	MN	58pg/ml	MN	88pg/ml
PPV	78,8%		98,1%	
NPV	99,3%		99,7%	
LR+	19,6		327	
LR-	0,04		0,02	

PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value, LR+: positive Likelihood Ratio, LR-: negative Likelihood Ratio

Bias- korrigierte obere Grenzwerte des EIA

* altersabhängige Grenzwerte nach der Formel $UC_{NMN} = (1,668 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Alter}^3) + 43,5$

** altersabhängige Grenzwerte nach der Formel $UC_{NMN} = (3,792 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Alter}^3) + 98,9$

Sowohl der positive als auch der negative Vorhersagewert sind von der Vortestwahrscheinlichkeit abhängig. Der positive Vorhersagewert beschreibt den Anteil der Patienten mit positivem Testergebnis, die tatsächlich an einem PPGL erkrankt sind. Bei den Messungen mit dem Immunoassay betrug dieser Wert unter Verwendung der Bias-korrigierten oberen Grenzwerte 78,8% und für LC-MS/MS 98,1%. Der negative Vorhersagewert spiegelt den Anteil der Patienten ohne PPGL an allen Patienten mit negativen Testresultat wider. Dieser Wert wurde für die Messungen mit dem Immunoassay als 99,3% und für LC-MS/MS als 99,7% berechnet.

Aufgrund des selektiven Patientenkollektivs mit einer Prätestwahrscheinlichkeit von 16%, ist die, von der Prävalenz unabhängige, Likelihood-Ratio aussagekräftiger. Die positive Likelihood-Ratio gibt an, um welchen Faktor häufiger ein positives Testresultat bei Patienten mit PPGL als ohne PPGL auftritt. Sie wurde für den EIA mit 19,6 und für LC-MS/MS mit 327 berechnet. Die negative Likelihood-Ratio gibt an, um welchen Faktor wahrscheinlicher ein negatives Testresultat bei Patienten mit PPGL als bei Patienten ohne PPGL auftritt. Dieser Wert war für den EIA 0,04 und für LC-MS/MS 0,02.

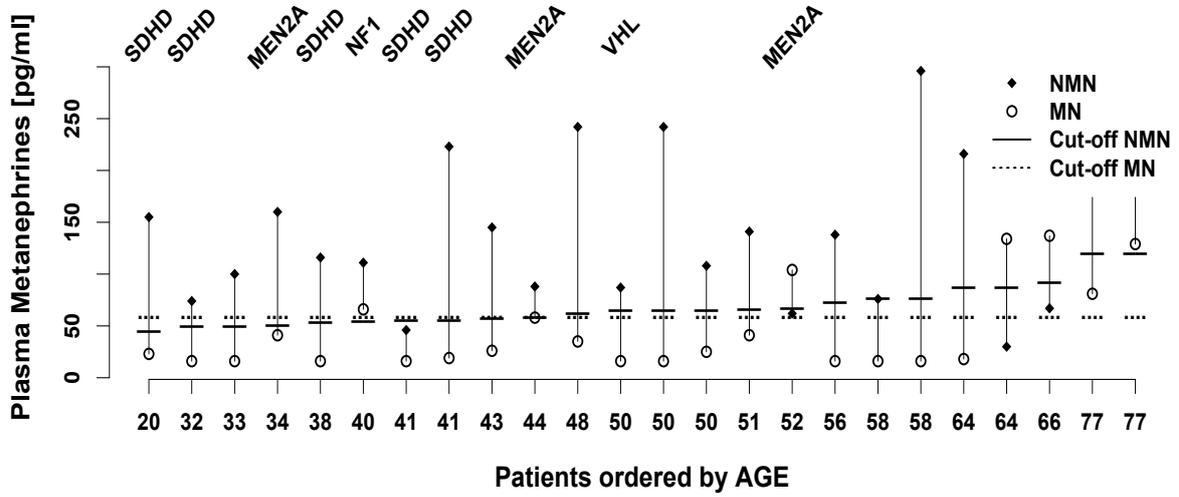
3.3.5 Messleistung im Graubereich

Viele richtig positive Messergebnisse können von den falsch positiven Resultaten bereits wegen ihrer größeren Differenz zu den oberen Grenzwerten der Referenzintervalle unterschieden werden [5]. Die Schwierigkeit besteht darin, nur moderat erhöhte Messergebnisse richtig zu interpretieren. Diese Werte liegen in einem Graubereich, dessen Obergrenzen als 2,2nmol/l für NMN und als 1,2nmol/l für MN definiert wurden [22]. Messresultate darüber sind höchstwahrscheinlich für ein PPGL (mit $\approx 100\%$ Spezifität) [22]. Bei Messwerten im Graubereich sind sowohl richtig positive als auch falsch positive Messresultate zu erwarten.

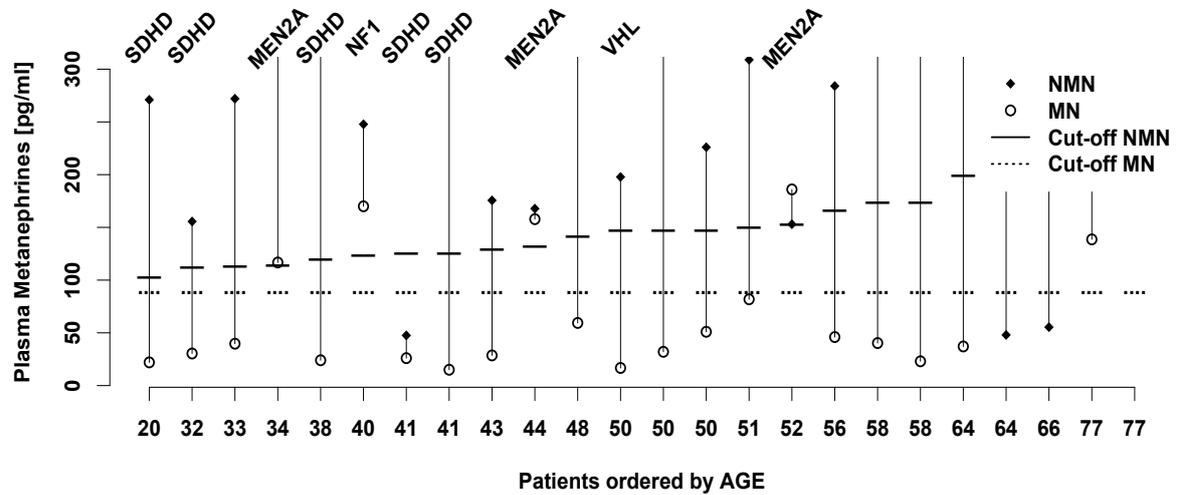
Dementsprechend wurden genauere Untersuchungen der Testleistungen beider Messmethoden im Graubereich vorgenommen. Es befanden sich 24 Messungen im Graubereich. Bei zehn dieser Patienten war eine Genmutation bekannt oder nachgewiesen. Die Differenzen der Messresultate zu den oberen Grenzwerten der Referenzintervalle waren von besonderem Interesse. Hier zeigte sich, dass die Differenzen der, von dem EIA gemessenen Werte zu den Bias-korrigierten oberen Grenzwerten geringer ausgeprägt waren als die Differenzen der, von LC-MS/MS gemessenen Werte zu deren oberen Grenzwerten (siehe Abbildung 7).

Abbildung 7: Messresultate im Graubereich

A) Plasmametaneprinkonzentrationen gemessen mit EIA



B) Plasmametaneprinkonzentrationen gemessen mit LC-MS/MS



Messresultate nach dem Alter geordnet, bekannte hereditäre Formen gekennzeichnet, dynamische altersabhängige obere Grenzwerte für NMN, statischer oberer Grenzwert für MN

3.4 Biochemische Phänotypisierung der hereditären PPGL

Die biochemischen Profile aller 15 Patienten mit hereditären PPGL und bekannter Genmutation wurden durch LC-MS/MS korrekt wiedergegeben. Durch Messungen des EIAs wurden zwei Patienten mit MEN2-Syndrom (34 und 44 Jahre alt) falsch als noradrenerg statt adrenerg klassifiziert.

Eine umfassende biochemische Phänotypisierung ist nur dann möglich, wenn alle drei methylierten Abbauprodukte der Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin präzise gemessen werden können. Da für den immunologischen Nachweis von MTY zum Zeitpunkt der Studiendurchführung kein EIA kommerziell erhältlich war, war das Erstellen eines vollständigen biochemischen Profils im Gegensatz zu LC-MS/MS nicht möglich.

3.5 Erhöhte MTY-Plasmakonzentrationen als Hinweis für Metastasen

Bei 21 Patientenproben wurden mit LC-MS/MS höhere MTY-Plasmakonzentrationen als der obere Grenzwert von 30 pg/ml gemessen. Bei zehn Patienten war der Messwert höher als 80 pg/ml. Acht dieser Patienten (80%) hatten Metastasen. Wohingegen nur drei (7%) der anderen 44 Patienten mit PPGL Metastasen aufwiesen.

4 Diskussion

Im direkten Vergleich mit LC-MS/MS ergab sich ein negativer Bias bei der MN- und NMN-Analyse für EIA. Zudem erwies sich ein fehlender immunologischer MTY-Nachweis als nachteilig.

Die zu Beginn aufgestellten Hypothesen konnten beide nicht bestätigt werden. Eine sichere Differenzierung zwischen Patienten mit und ohne PPGL war unter Verwendung der oberen Grenzwerte nach Herstellerangaben durch den EIA nicht möglich. Die diagnostische Testleistung erreicht nur nach Anpassung der Grenzwerte ein vergleichbares Niveau.

Dieses Ergebnis, dessen Bedeutung, dessen potentielle Ursachen sowie weiterführende Aspekte werden unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage nachfolgend diskutiert.

4.1 Diagnostische Testqualitäten von Immunoassays und LC-MS/MS

Bisher haben drei Studien Immunoassays und LC-MS/MS im Bezug auf die Plasmametanephrinanalyse direkt miteinander verglichen. Bei der Studie von Lenz et al. (2006) zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen einem RIA und LC-MS/MS bei übereinstimmend hoher Präzision [41]. Im Patientenkollektiv befand sich allerdings kein Patient mit PPGL, sodass ein Vergleich beider Messverfahren bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität nicht möglich war. Neben der Korrelation beider Messverfahren ist jedoch gerade ein Vergleich der diagnostischen Testqualität von besonderem Interesse. Darüber lassen neben der vorliegenden nur noch zwei weitere Studien eine Aussage zu [45, 53].

4.1.1 Negativer Bias für EIA

Im Gegensatz zu Lenz et al. (2006) zeigten Peaston et al. (2010), Mullins et al. (2012) und die vorliegende Studie einen erheblichen negativen Bias bezüglich der Messungen zwischen EIA (alle von LDN) und LC-MS/MS.

In der retrospektiven Studie von Peaston et al. (2010) bestand das Patientenkollektiv aus 151 Patienten, darunter 38 Patienten mit bestätigtem PPGL. Die Blutentnahme wurde an nüchternen, sitzenden Patienten durchgeführt. Der

negative Bias für NMN und MN betrug 25%. Es resultierten zwei falsch negative Messergebnisse durch den EIA. Die Sensitivität für den EIA war 95%, wohingegen die für LC-MS/MS 100% betrug. Die Spezifitäten waren mit 96% für den EIA und 98% für LC-MS/MS vergleichbar [45].

Auch Mullins et al. (2012) kamen zu dem Resultat, dass der EIA niedrigere Messergebnisse als die Referenzmethode LC-MS/MS lieferte. Hier wurde in einer prospektiven Studie an 72 Patienten ein negativer Bias von 32% für NMN und eine geringe Abweichung für MN beschrieben. Die Blutentnahmen erfolgten hier an nicht nüchternen, sitzenden Patienten. Es wurden alle 13 Patienten mit histologisch bestätigtem PPGL durch den EIA richtig identifiziert [53]. Das resultierte in einer 100%-Sensitivität für beide Messmethoden. Die Spezifität war mit 88,3% für den EIA niedriger als die Spezifität von LC-MS/MS bei 95%.

Die vorliegende, prospektive Studie mit höherem Studenumfang bestätigte ebenfalls einen negativen Bias für die Messresultate des EIAs im Vergleich mit LC-MS/MS. Dieser betrug für NMN 60% und für MN 39%. Die Blutentnahmen erfolgten hier unter standardisierten Bedingungen an nüchternen, liegenden Patienten. Es wurden 14 von 54 Patienten mit PPGL mit dem EIA falsch negativ getestet. Es resultierte eine signifikant niedrigere Sensitivität von 74,1% im Vergleich zu 98,1% für LC-MS/MS. Die Spezifitäten waren mit 98,9% für den EIA und 99% für LC-MS/MS ähnlich.

Mit höherem Studenumfang und durch Blutentnahmen unter Standardbedingungen bekräftigt die vorliegende Studie, dass der EIA die Plasmakonzentrationen für NMN und MN niedriger misst als LC-MS/MS. Unter Verwendung der oberen Grenzwerte nach Herstellerangaben führt dies zu einer insuffizienten Sensitivität des EIAs.

4.1.2 ROC-Kurvenanalysen mit vergleichbarer AUC für EIA und LC-MS/MS

Die Berechnungen der Flächen unter den ROC-Kurven geben Auskunft darüber, ob die Messungen der Plasmametaneprine durch den EIA und LC-MS/MS eine korrekte Differenzierung zwischen Patienten mit und ohne PPGL zulassen.

Mullins et al. (2012) führten ebenfalls AUC-Berechnungen unter den ROC-Kurven für EIA und LC-MS/MS durch. Hier zeigten sich für beide Messmethoden eine hohe AUC (LC-MS/MS: 0,973, EIA: 0,969) für die Plasmametaneprinanalysen und ein nur geringer Unterschied der beiden AUCs von -0,004. In der vorliegenden Studie waren die Berechnungen der AUC für den EIA 0,993 und 0,985 für LC-MS/MS und ebenfalls ein nur geringer Unterschied von +0,008 zu verzeichnen.

Übereinstimmend kann gelten, dass beide Messmethoden die Patienten mit und ohne PPGL sicher differenzieren und eine hohe diagnostische Testleistung aufweisen.

Der negative Bias und die niedrigere Sensitivität für den EIA sind dennoch nicht zu vernachlässigen. Als mögliche Ursachen hierfür ist auf der einen Seite von einem Kalibrierungsproblem und auf der anderen Seite von inadäquat zu hoch gewählten oberen Grenzwerten auszugehen.

4.2 Kalibrierungsproblem des EIAs

Auch erste Serien von Qualitätsbewertungsprogrammen stellten einen negativen Bias für EIA im Vergleich zu LC-MS/MS fest [51, 52]. Hierfür wurde gefriergetrocknetes Plasma zunächst mit synthetischen racemischen Enantiomeren der Metaneprine angereichert [51]. Dieses erste Ergebnis war kritisch zu werten, da kommerziell erhältliche Immunoassays enantioselektiv sind und nur die biologisch relevanten L-Formen der Metaneprine messen [40]. In einer nachfolgenden Serie wurde gefriergetrocknetes Plasma mit, aus menschlichem Urin gewonnenen, natürlichen Metaneprinen versehen. Man ging davon aus, dass darin nur L-Enantiomere enthalten waren, da in der Literatur bisher keine Evidenz über D-Enantiomere der Metaneprine in menschlichem Urin besteht [52]. Die Kalibrierung des EIAs durch den Hersteller erfolgte ebenfalls nach dieser Prämisse. Diese Kalibrierung scheint weniger präzise zu sein, als die

Kalibrierung von LC-MS/MS. LC-MS/MS kann unkompliziert mit einem kommerziell erhältlichen Racemat der Metanephrene kalibriert werden, da diese Methode nicht zwischen beiden Enantiomere unterscheidet. Dies legt die Vermutung nahe, dass die diffizilere Kalibrierung des EIAs mitunter eine Rolle für den negativen Bias im Vergleich zu LC-MS/MS spielen könnte.

Bei den Qualitätsbewertungsprogrammen konnten zusätzlich auch Matrixeffekte an dem negativen Bias beteiligt sein. Diese Effekte wurden in der vorliegenden Studie minimiert, indem natürliche Patientenproben jeweils sowohl mittels EIA als auch mittels LC-MS/MS analysiert wurden.

4.3 Revision oberer Grenzwerte des EIAs

Die eigenen Ergebnisse präsentieren eine insuffiziente Sensitivität des EIAs unter Verwendung der, vom Hersteller angegeben oberen Grenzwerte. In einem Viertel der Fälle wurden Patienten mit PPGL nicht diagnostiziert. Die Berechnung der AUC im Rahmen der ROC-Kurven-Analyse demonstrierte dennoch eine vergleichbar hohe Testqualität beider Messverfahren. Dies indizierte eine Revision der ungeeignet hohen oberen Grenzwerte für den EIA.

4.3.1 Validierte Grenzwerte unter Standardbedingungen

Die Höhe der oberen Grenzwerte hängt entscheidend von den präanalytischen Bedingungen der Blutentnahme ab. Werden Grenzwerte durch Blutentnahmen an sitzenden Patienten determiniert, sind Referenzintervalle mit höheren Werten nötig. Diese kompromittieren die diagnostische Sensitivität und führen zu falsch negativen Ergebnissen, wie eine Studie von Därr et al. (2014) zeigen konnte [37].

Um die optimale diagnostische Testleistung von LC-MS/MS zu gewährleisten, führten Eisenhofer et al. (2013) eine Studie zur Validierung der Referenzintervalle durch [54]. Die unter Standardbedingungen neu validierten Grenzwerte wurden in unserer Studie für LC-MS/MS angewandt und demonstrierten eine nahezu optimale diagnostische Sensitivität (98,1% ohne MTY, 100% mit MTY) und Spezifität (99,7% ohne MTY, 98,6% mit MTY) für diese Messmethode.

Der Hersteller des EIAs macht keine Angaben zu dessen Setting der Grenzwertfestlegung. Er weist vielmehr darauf hin, dass diese nur als Anhaltspunkte gelten und empfiehlt explizit eigene Referenzintervalle festzulegen. Dies leitliniengerecht durchzuführen, ist besonders für kleine Labore aufgrund der Seltenheit der PPGL nicht realisierbar, sodass viele Labore die Angaben des Herstellers ohne Validierung verwenden. Die eigene Studie konnte zeigen, dass dies mit einer niedrigen Sensitivität und dem Risiko einhergeht, PPGL-Patienten in bis zu einem Viertel der Fälle nicht zu diagnostizieren. Es erscheint umso wichtiger geeignete Referenzintervalle im Rahmen von Studien an endokrinen Zentren in Zusammenarbeit mit den Herstellern von Immunoassays neu zu generieren. Bis dahin können die optimierten Grenzwerte dieser Studie als bessere Anhaltspunkte im Vergleich zu den Grenzwerten des Herstellers dienen.

4.3.2 ROC-Kurven-Analyse zur Grenzwertoptimierung

Zwei Studien beschreiben bisher eine Grenzwertoptimierung für Immunoassaymethoden durch ROC-Kurven-Analysen. Unger et al. (2006) führten für einen RIA niedrigere Grenzwerte als die Herstellerangaben (DLD Hamburg) ein. Die Blutproben waren von 92 nicht nüchternen, sitzenden Patienten mit adrenalem Tumor, davon 24 mit Phäochromozytomen, entnommen worden. Hier betrug die Sensitivität für die Plasmametanephrine 95,8% bei einer geringen Spezifität von nur 79,4% [26]. In einer aktuelleren retrospektiven Studie von Pussard et al. (2014) wurden ebenfalls für einen RIA deutlich niedrigere Referenzintervalle als die Herstellerangaben (IBL Hamburg) empfohlen. Die oberen Grenzwerte wurden durch ROC-Kurven-Analysen an einem Patientenkollektiv von 533 Patienten, darunter 59 Patienten mit PPGL, erhoben. Dabei ergaben sich ein Wert von 100pg/ml (0,55nmol/l) für NMN und ein Wert von 70pg/ml (0,36nmol/l) für MN. Die Sensitivität betrug 100%, die Spezifität 96%. Die Blutentnahmen erfolgten hier unter Standardbedingungen an nüchternen, liegenden Patienten [46]. Wenn man diese Grenzwerte bei den Messdaten der vorliegenden Studie anwendete, erhielt man eine Verbesserung der Sensitivität von 74% auf 90%. Die durch die eigene ROC-Kurvenanalyse optimierten Grenzwerte führten dagegen zu einer Sensitivität von 98,1%.

Dadurch, dass die vorliegende Studie im Vergleich zu den beiden oben genannten Studien einen direkten Vergleich zu der Referenzmethode LC-MS/MS zuließ, konnte ferner eine Grenzwertoptimierung durch eine Bias-Korrektur vorgenommen werden.

4.3.3 Bias-Korrektur zur Grenzwertoptimierung

Bei dem direkten Vergleich der Messmethoden EIA und LC-MS/MS wurde ein negativer Bias von 60% für NMN und 39% für MN nachgewiesen. Dieser Nachweis erlaubte, die oberen Grenzwerte des EIAs an die, durch eine Studie von Eisenhofer et al. (2013) validierten optimalen Grenzwerte von LC-MS/MS anzupassen. Dadurch wurde eine diagnostische Sensitivität von 96,2% und eine Spezifität von 95% für den EIA erreicht und entsprach damit annähernd den Werten der Referenzmethode LC-MS/MS mit 98,1% Sensitivität und 99,7% Spezifität. Eine Bias-Korrektur zur Optimierung der oberen Grenzwerte des EIAs wurde von den Studien von Peaston et al. (2010) und Mullins et al. (2012), die ebenfalls beide Messmethoden direkt miteinander verglichen haben, nicht durchgeführt.

4.4 Diagnostische Testleistung bei besonderem Patientenkollektiv und im Graubereich

Für die Beurteilung der diagnostischen Testleistung sind insbesondere nahe am oberen Grenzwert gelegenen Messresultate von Interesse. Ebenso ist die hohe Vortestwahrscheinlichkeit des Patientenkollektivs im Bezug auf die diagnostische Testleistung zu diskutieren.

4.4.1 Patientenkollektiv mit hoher Vortestwahrscheinlichkeit

Als Anhaltspunkt für die Aussagekraft eines diagnostischen Tests dienen die positiven und negativen Vorhersagewerte. Diese sind jedoch von der Prävalenz abhängig. Das selektive Patientenkollektiv dieser Studie enthielt 54 Patienten mit PPGL, was einem Anteil von 16% entsprach. Diese Prättestwahrscheinlichkeit liegt deutlich höher als die Prävalenz in der Normalbevölkerung. Dementsprechend sind die Angaben der positiven und negativen prädiktiven Werte nur als Anhaltspunkte für die Messleistung bei Hochrisikogruppen zu sehen: 78,8% der Patienten mit einem, durch den EIA gemessenen positiven Messresultat hatten

tatsächlich ein PPGL. Wohingegen 98,1% der Patienten mit einem, durch LC-MS/MS positiv gemessenen Resultat an einem PPGL erkrankt waren. Bei niedrigerer Prävalenz sinkt der positiv prädiktive Wert und die Anzahl der falsch positiven Messergebnisse steigt. Viele falsch positive Resultate würden bei zahlreichen Patienten Verunsicherungen hervorrufen, zeitintensive Betätigungstests und kostenintensive sowie strahlenbelastende radiologische Verfahren nach sich ziehen. Folglich ist es denkbar, dass LC-MS/MS bei niedriger Vortestwahrscheinlichkeit dem EIA überlegen sein könnte.

Unabhängig von der Prättestwahrscheinlichkeit sind die positive und negative Likelihood Ratio. Beide Messmethoden haben mit positiven Wahrscheinlichkeitsverhältnissen >10 und negativen Wahrscheinlichkeitsverhältnissen $<0,1$ in Anlehnung an Jeschke et al. [56] eine überzeugende diagnostische Evidenz. Bessere Werte zeigen sich dennoch erneut für LC-MS/MS.

4.4.2 Beurteilung der Testqualität im Graubereich

In dem Kapitel 3.3.5 definierten Graubereich können sich sowohl richtig als auch falsch positive Messresultate befinden. Moderat erhöhte Messwerte zeigen sich vor allem bei Patienten mit kleinen Tumoren, da die Tumorgöße mit der sekretorischen Aktivität korreliert [4].

Die Messergebnisse sind eindeutiger zu interpretieren, je größer ihre Differenzen zu den oberen Grenzwerten der Referenzintervalle sind. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass eben diese Differenzen bei Messresultaten gemessen mit EIA geringer ausgeprägt waren als diejenigen gemessen mit LC-MS/MS.

Dementsprechend lässt sich schlussfolgern, dass Situationen in denen von kleinen Tumoren auszugehen ist, Messungen mit EIA sorgfältiger zu interpretieren sind. Dies betrifft vor allem Screeninguntersuchungen an asymptomatischen Patienten bezüglich eines hereditären Syndroms, Patienten mit kleinen Inzidentalomen sowie Nachsorgeuntersuchungen zur Früherkennung von Rezidiven.

4.5 Fehlende MTY-Analyse nachteilig für EIA

Zum Zeitpunkt der Studiendurchführung war kein EIA für einen immunologischen MTY-Nachweis kommerziell erhältlich. Hieraus ergaben sich folgende Nachteile für EIA im Vergleich zu LC-MS/MS.

4.5.1 Unvollständiges biochemisches Profil

Das biochemische Profil der Patienten mit hereditären PPGL gibt Hinweise auf die Lokalisation des Tumors und auf die zugrundeliegende Genmutation [23]. Eine korrekte biochemische Phänotypisierung grenzt die vermeintlich betroffenen Gene auf eine geringe Anzahl ein, sodass eine kosteneffiziente Genotypisierung ermöglicht wird [23]. Die ursächliche Mutation lässt wiederum Rückschlüsse auf weitere, mit einem familiären Syndrom assoziierte Tumoren sowie auf das Malignitätsrisiko der PPGL zu [21]. Ein vollständiges biochemisches Profil erhält man nur dann, wenn die verwendete Messmethode eine präzise Analyse aller drei O-methylierten Katecholaminmetabolite garantiert. In der vorliegenden Studie demonstrierte EIA im Vergleich zu LC-MS/MS eine geringere analytische Sensitivität, da mehr Messresultate unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Ferner wurden bei der biochemischen Phänotypisierung mit EIA zwei Patienten mit MEN-2-Syndrom falsch als noradrenerg charakterisiert. Aufgrund dieser Ergebnisse und aufgrund des fehlenden immunologischen Nachweises für MTY war eine präzise und ganzheitliche biochemische Phänotypisierung mit EIA im Vergleich zu LC-MS/MS nicht möglich.

4.5.2 Fehlende Rückschlüsse auf Metastasen nach der biochemischen Analyse

Erhöhte MTY-Plasmakonzentrationen geben Hinweise auf das Vorliegen von Metastasen [7, 43]. Eisenhofer et al. (2012) und Peitzsch et al. (2013) zeigten, dass die Höhe von MTY-Plasmakonzentrationen einen Anhaltspunkt für eine Differenzierung zwischen Patienten mit und ohne Metastasen liefere [43]. Auch in der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass 80% der Patienten mit stark erhöhten Plasma-MTY-Konzentrationen eine metastatische Erkrankung aufwiesen. Ohne die Messungen von MTY-Konzentrationen mit EIA konnten im Vergleich zu

LC-MS/MS keine Aussagen über das Vorhandensein von Metastasen nach der biochemischer Analyse getroffen werden.

4.5.3 Keine Identifizierung dopaminproduzierender Tumoren

Ohne MTY-Messungen ist es nicht möglich Patienten mit PPGL zu identifizieren, deren Tumoren sich ausschließlich mit einem gesteigerten Dopaminmetabolismus manifestieren. In der vorliegenden Studie wurde ein Patient mit einem dopaminproduzierenden, metastasiertem Paragangliom durch den EIA nicht korrekt erkannt, da dessen NMN- und MN-Konzentrationen im Referenzbereich lagen und eine Messung von MTY durch den EIA nicht möglich war. Nur durch die MTY-Analyse mit LC-MS/MS konnte dieser Patient korrekt identifiziert und das Messverfahren damit als 100% sensitiv beschrieben werden.

Sofern nicht in Zukunft ein geeigneter immunologischer MTY-Nachweis zur Verfügung steht, wird der EIA bezüglich oben genannter Punkte LC-MS/MS immer unterlegen sein.

4.6 Schlussfolgerungen und zukünftige Aspekte

LC-MS/MS war zum Zeitpunkt der Studiendurchführung bezüglich der Identifizierung von Patienten mit ausschließlich dopaminproduzierenden Tumoren, der vollständigen biochemischen Phänotypisierung und der Möglichkeit Hinweise für eine vorliegende Metastasierung zu geben dem EIA überlegen. Hierfür war eine fehlende kommerzielle Verfügbarkeit eines immunologischen Nachweises für MTY ursächlich. Die Entwicklung eines geeigneten Immunoassays für MTY ist von relevanter Bedeutung.

Anhand eines selektiven Patientenkollektivs mit hoher Vortestwahrscheinlichkeit untersuchte die vorliegende Studie die diagnostische Testleistung beider Messverfahren. Weitere Untersuchungen an Patientenkollektiven mit einer, der PPGL- Prävalenz entsprechenden Vortestwahrscheinlichkeit sind nötig. Zudem würden Studien mit einer höheren Anzahl an Messergebnissen im Graubereich interessante Ergebnisse liefern. Diese Resultate gäben Auskunft darüber, ob LC-MS/MS der, in dieser Arbeit aufgestellten Thesen entsprechend, in jenen Bereichen dem EIA überlegen sein könnte.

Das Wissen über die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Messmethoden spielt eine wesentliche Rolle bei Vor- und Nachsorgeuntersuchungen von betroffenen Patienten in verschiedenen endokrinen Zentren. Wenn Patienten Plasmametaneprininmessungen nicht immer im gleichen Labor durchführen lassen, sollten Daten über die Vergleichbarkeit zwischen den verwendeten Messverfahren vorliegen, um eine adäquate Interpretation der Messergebnisse zu gewährleisten. Entscheidend hierfür ist eine breite Teilnahme der Laboratorien an Qualitätssicherungsprogrammen für die Plasmametaneprininanalyse.

Für diese Qualitätssicherungsprogramme und für die Kalibrierung von Immunoassays ist es von großer Bedeutung eine Lösung für das Problem der fehlenden enantioselektiven synthetischen Standards zu finden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie postulieren eine nötige Rekalibrierung des EIAs wegen der deutlich niedrigeren Messresultate im Vergleich zu LC-MS/MS. Eine leitliniengerechte Validierung der Referenzintervalle ist erforderlich.

5 Zusammenfassung

Die biochemische Diagnostik von Phäochromozytomen und Paragangliomen (PPGL) basiert auf einem gesteigerten Katecholaminmetabolismus in dessen Folge es zu erhöhten Plasmametanephrinkonzentrationen (Normetanephrin NMN und/oder Metanephrin MN) kommt. Die variable endokrine Aktivität der Tumoren sowie Hormonzentrationen im Nanomol-pro-Liter-Bereich stellen hohe Anforderungen an analytische Messmethoden. Nicht oder spät diagnostizierte PPGL können lebensbedrohliche katecholaminerge Krisen verursachen. Demzufolge sind präzise Nachweisverfahren und validierte Messmethoden für die biochemische Diagnostik unerlässlich. Inwiefern die Messverfahren enzymgekoppelter Immunoassay (EIA) und Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) zur Analyse von Plasmametanephrinen in gleichem Maße geeignet sind, ist aufgrund der kontroversen Studienlage unklar.

Hierfür wurde eine Substudie im Rahmen der prospektiven monoaminproduzierenden Tumor (PMT)-Studie an fünf europäischen Zentren durchgeführt. Es wurden 341 Patienten (174 Männer, 167 Frauen), darunter 54 Patienten mit PPGL eingeschlossen. Die Blutproben wurden unter Standardbedingungen entnommen und mit beiden Messmethoden in spezialisierten Zentren analysiert. Für den EIA zeigte sich ein negativer Bias von 60% für NMN und 39% für MN. Dieser führte unter Verwendung oberer Grenzwerte nach Herstellerangaben zu einer Sensitivität von 74,1% und einer Spezifität von 98,9%. Für LC-MS/MS wurde eine signifikant höhere Sensitivität von 98,1% und eine Spezifität von 99,7% gezeigt. Die Berechnung der area under the curve (AUC) im Zuge der receiver-operating-characteristic (ROC)-Kurven-Analyse indizierte jedoch eine vergleichbar hohe diagnostische Testleistung für EIA (0,993) und LC-MS/MS (0,985). Durch eine Bias-korrigierte Grenzwertoptimierung stieg die Sensitivität des EIAs auf 96,2% bei einer Spezifität von 95,1% und führte dadurch zu einer vergleichbaren diagnostischen Testqualität wie LC-MS/MS.

Fazit: Bei diesem kommerziell erhältlichen EIA resultiert die Verwendung oberer Grenzwerte nach Herstellerangaben in einer insuffizienten Sensitivität. Dies birgt das Risiko, Patienten mit PPGL nicht zu diagnostizieren. Eine Rekalibrierung des EIAs sowie eine Validierung der Referenzintervalle sind erforderlich.

Abstract

Context: Reports conflict concerning measurements of plasma metanephrines for diagnosis of pheochromocytomas/paragangliomas (PPGL) by immunoassays compared to other methods.

Objective: To compare the performance of a commercially available enzyme-linked immunoassay (EIA) with liquid chromatographic tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) measurements of metanephrines to diagnose PPGLs.

Design: Sub-study of a prospective, multicenter trial to study the biochemical profiles of monoamine-producing tumors

Patients: Patients included 174 males and 167 females with suspected PPGL (median age 54 years), of whom 54 had confirmed PPGL.

Interventions: Plasma metanephrines were measured by EIA and LC-MS/MS, each in a specialized laboratory.

Results: Plasma normetanephrine and metanephrine were measured 60% and 39% lower by EIA than by LC-MS/MS. Using upper cut-offs stipulated for the EIA, diagnostic sensitivity was only 74.1% at a specificity of 99.3%. In contrast, use of similar cut-offs for metanephrine and overall lower age-adjusted cutoffs for normetanephrine measured by LC-MS/MS returned a diagnostic sensitivity and specificity of 98.1% and 99.7%. Areas under receiver-operating characteristic curves, nevertheless, indicated comparable diagnostic performance of the EIA (0.993) and LC-MS/MS (0.985). Diagnostic sensitivity for the EIA increased to 96.2% with minimal loss in specificity (95.1%) following use of cut-offs for the EIA adapted to correct for the negative bias.

Conclusions: EIA underestimates plasma metanephrines and diagnostic sensitivity is poor using commonly stipulated cut-offs, resulting in high risk for missing patients with PPGLs. Correction of this shortcoming can be achieved by appropriately determined cut-offs resulting in comparable diagnostic performance of EIA and LC-MS/MS assays.

6 Literaturverzeichnis

1. Brouwers, F.M., et al., *Emergencies caused by pheochromocytoma, neuroblastoma, or ganglioneuroma*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2006. **35**(4): p. 699-724, viii.
2. Schurmeyer, T.H., et al., *Cardiological effects of catecholamine-secreting tumours*. *Eur J Clin Invest*, 1997. **27**(3): p. 189-95.
3. Eisenhofer, G., et al., *Biochemical and clinical manifestations of dopamine-producing paragangliomas: utility of plasma methoxytyramine*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(4): p. 2068-75.
4. 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.
5. Lenders, J.W., et al., *Phaeochromocytoma*. *Lancet*, 2005. **366**(9486): p. 665-75.
6. Whalen, R.K., A.F. Althausen, and G.H. Daniels, *Extra-adrenal pheochromocytoma*. *J Urol*, 1992. **147**(1): p. 1-10.
7. Eisenhofer, G., et al., *Plasma methoxytyramine: a novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status*. *Eur J Cancer*, 2012. **48**(11): p. 1739-49.
8. Elder, E.E., G. Elder, and C. Larsson, *Pheochromocytoma and functional paraganglioma syndrome: no longer the 10% tumor*. *J Surg Oncol*, 2005. **89**(3): p. 193-201.
9. Eisenhofer, G., et al., *Pheochromocytoma*. *Clin Chem*, 2013. **59**(3): p. 466-72.
10. Sutton, M.G., S.G. Sheps, and J.T. Lie, *Prevalence of clinically unsuspected pheochromocytoma. Review of a 50-year autopsy series*. *Mayo Clin Proc*, 1981. **56**(6): p. 354-60.
11. Krane, N.K., *Clinically unsuspected pheochromocytomas. Experience at Henry Ford Hospital and a review of the literature*. *Arch Intern Med*, 1986. **146**(1): p. 54-7.
12. Lo, C.Y., et al., *Adrenal pheochromocytoma remains a frequently overlooked diagnosis*. *Am J Surg*, 2000. **179**(3): p. 212-5.
13. Fliedner, S.M., H. Lehnert, and K. Pacak, *Metastatic paraganglioma*. *Semin Oncol*, 2010. **37**(6): p. 627-37.
14. Ayala-Ramirez, M., et al., *Clinical risk factors for malignancy and overall survival in patients with pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas: primary tumor size and primary tumor location as prognostic indicators*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(3): p. 717-25.
15. Mannelli, M., et al., *Subclinical phaeochromocytoma*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2012. **26**(4): p. 507-15.
16. Eisenhofer, G., et al., *Plasma metanephrines are markers of pheochromocytoma produced by catechol-O-methyltransferase within tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(6): p. 2175-85.
17. Mazzaglia, P.J., *Hereditary pheochromocytoma and paraganglioma*. *J Surg Oncol*, 2012. **106**(5): p. 580-5.
18. Mantero, F., et al., *A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(2): p. 637-44.
19. Mannelli, M., et al., *Clinically guided genetic screening in a large cohort of italian patients with pheochromocytomas and/or functional or nonfunctional paragangliomas*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(5): p. 1541-7.
20. Amar, L., et al., *Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(34): p. 8812-8.

21. Kolackov, K., K. Tupikowski, and G. Bednarek-Tupikowska, *Genetic aspects of pheochromocytoma*. *Adv Clin Exp Med*, 2012. **21**(6): p. 821-9.
22. Lenders, J.W., et al., *Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best?* *JAMA*, 2002. **287**(11): p. 1427-34.
23. Eisenhofer, G., et al., *Measurements of plasma methoxytyramine, normetanephrine, and metanephrine as discriminators of different hereditary forms of pheochromocytoma*. *Clin Chem*, 2011. **57**(3): p. 411-20.
24. van Berkel, A., J.W. Lenders, and H.J. Timmers, *Diagnosis of endocrine disease: Biochemical diagnosis of phaeochromocytoma and paraganglioma*. *Eur J Endocrinol*, 2014. **170**(3): p. R109-19.
25. Sawka, A.M., et al., *A comparison of biochemical tests for pheochromocytoma: measurement of fractionated plasma metanephrines compared with the combination of 24-hour urinary metanephrines and catecholamines*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(2): p. 553-8.
26. Unger, N., et al., *Diagnostic value of various biochemical parameters for the diagnosis of pheochromocytoma in patients with adrenal mass*. *Eur J Endocrinol*, 2006. **154**(3): p. 409-17.
27. Guller, U., et al., *Detecting pheochromocytoma: defining the most sensitive test*. *Ann Surg*, 2006. **243**(1): p. 102-7.
28. Pacak, K., et al., *Pheochromocytoma: recommendations for clinical practice from the First International Symposium. October 2005*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007. **3**(2): p. 92-102.
29. Eisenhofer, G., et al., *Regional release and removal of catecholamines and extraneuronal metabolism to metanephrines*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. **80**(10): p. 3009-17.
30. Pacak, K., *Phaeochromocytoma: a catecholamine and oxidative stress disorder*. *Endocr Regul*, 2011. **45**(2): p. 65-90.
31. Eisenhofer, G., et al., *Plasma metanephrines: a novel and cost-effective test for pheochromocytoma*. *Braz J Med Biol Res*, 2000. **33**(10): p. 1157-69.
32. Eisenhofer, G., et al., *Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in phaeochromocytoma*. *Endocr Relat Cancer*, 2011. **18**(1): p. 97-111.
33. 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.
34. Lenders, J.W., et al., *Determination of metanephrines in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection*. *Clin Chem*, 1993. **39**(1): p. 97-103.
35. 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.
36. Lenders, J.W., et al., *Is supine rest necessary before blood sampling for plasma metanephrines?* *Clin Chem*, 2007. **53**(2): p. 352-4.
37. Darr, R., et al., *Biochemical diagnosis of phaeochromocytoma using plasma-free normetanephrine, metanephrine and methoxytyramine: importance of supine sampling under fasting conditions*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2014. **80**(4): p. 478-86.
38. 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.
39. Lagerstedt, S.A., D.J. O'Kane, and R.J. Singh, *Measurement of plasma free metanephrine and normetanephrine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma*. *Clin Chem*, 2004. **50**(3): p. 603-11.

40. Manz, B., et al., *Development of enantioselective immunoassays for free plasma metanephrines*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1018**: p. 582-7.
41. Lenz, T., et al., *Multicenter study on the diagnostic value of a new RIA for the detection of free plasma metanephrines in the work-up for pheochromocytoma*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1073**: p. 358-73.
42. He, X. and M. Kozak, *Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for plasma-free metanephrines with ion-pairing turbulent flow online extraction*. Anal Bioanal Chem, 2012. **402**(9): p. 3003-10.
43. Peitzsch, M., et al., *Analysis of plasma 3-methoxytyramine, normetanephrine and metanephrine by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: utility for diagnosis of dopamine-producing metastatic pheochromocytoma*. Ann Clin Biochem, 2013. **50**(Pt 2): p. 147-55.
44. Petteys, B.J., et al., *Performance characteristics of an LC-MS/MS method for the determination of plasma metanephrines*. Clin Chim Acta, 2012. **413**(19-20): p. 1459-65.
45. 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.
46. 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.
47. Gao, Y.C., et al., *Comparison of free plasma metanephrines enzyme immunoassay with (131)I-MIBG scan in diagnosis of pheochromocytoma*. Clin Exp Med, 2008. **8**(2): p. 87-91.
48. Procopiou, M., et al., *Evaluation of an enzyme immunoassay for plasma-free metanephrines in the diagnosis of catecholamine-secreting tumors*. Eur J Endocrinol, 2009. **161**(1): p. 131-40.
49. Christensen, T.T., J. Frystyk, and P.L. Poulsen, *Comparison of plasma metanephrines measured by a commercial immunoassay and urinary catecholamines in the diagnosis of pheochromocytoma*. Scand J Clin Lab Invest, 2011. **71**(8): p. 695-700.
50. Sarathi, V., et al., *Performance of plasma fractionated free metanephrines by enzyme immunoassay in the diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma*. Endocr Pract, 2011. **17**(5): p. 759-65.
51. Pillai, D., et al., *Proficiency test of plasma free and total metanephrines: report from a study group*. Clin Chem Lab Med, 2009. **47**(6): p. 786-90.
52. Pillai, D. and S. Callen, *Pilot quality assurance programme for plasma metanephrines*. Ann Clin Biochem, 2010. **47**(Pt 2): p. 137-42.
53. Mullins, F., et al., *Enzyme-linked immunoassay for plasma-free metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma in adults is not ideal*. Clin Chem Lab Med, 2012. **50**(1): p. 105-10.
54. Eisenhofer, G., et al., *Reference intervals for plasma free metanephrines with an age adjustment for normetanephrine for optimized laboratory testing of pheochromocytoma*. Ann Clin Biochem, 2013. **50**(Pt 1): p. 62-9.
55. Hanley, J.A. and B.J. McNeil, *A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases*. Radiology, 1983. **148**(3): p. 839-43.
56. Jaeschke, R., G. Guyatt, and D.L. Sackett, *Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. A. Are the results of the study valid? Evidence-Based Medicine Working Group*. JAMA, 1994. **271**(5): p. 389-91.

Anhang
Gebrauchsanweisung EIA

 **LDN Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG**
Am Eichenhain 1, 48531 Nordhorn
Telefon: +49-5921-8197 0
Telefax: +49-5921-8197 222
e-mail: info@ldn.de
Internet: <http://www.ldn.de>

LDN[®]

Instructions for use
2-MET Plasma ELISA Fast Track

REF BA E-8300


2 x 96


+2^{°C}

IVD

CE

Metanephrine–Normetanephrine Plasma ELISA

1. Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of free Metanephrine and free Normetanephrine in plasma.

First, the plasma proteins are removed by precipitation. After this Metanephrine (Metadrenaline) and Normetanephrine (Normetadrenaline) are quantitatively acylated.

The subsequent competitive ELISA kit uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The acylated standards, controls and samples and the solid phase bound analytes compete for a fixed number of antiserum binding sites. After the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antiserum 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. The reaction is monitored at 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standards.

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

2. Advice on handling the test

2.1 Reliability of the test results

In order to assure a reliable evaluation of the test results it must be conducted according to the instructions included and in accordance with current rules and guidelines (GLP, RILIBAK, etc.). Special attention must be paid to control checks for precision and correctness during the test; the results of these control checks have to be within the norm range. In case of significant discrepancies between the pre-set assay characteristics of this test and the actual results please contact the manufacturer of the test kit for further instructions.

It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals. The values reported in this test instruction are only indicative.

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.

2.2 Complaints

In case of complaints please submit to the manufacturer a written report containing all data as to how the test was conducted, the results received and a copy of the original test printout. Please contact the manufacturer to obtain a reclamation form and return it completely filled in to the manufacturer.

2.3 Warranty

This test kit was produced according to the latest developments in technology and subjected to stringent internal and external quality control checks. Any alteration of the test kit or the test procedure as well as the usage of reagents from different charges may have a negative influence on the test results and are therefore not covered by warranty. The manufacturer is not liable for damages incurred in transit.

2.4 Disposal

Residual substances and/or all remaining chemicals, reagents and ready for use solutions, are special refuse. The disposal is subject to the laws and regulations of the federation and the countries. About the removal of special refuse the responsible authorities or refuse disposal enterprises inform. The disposal of the kit must be made according to the national official regulations. Legal basis for the disposal of special refuse is the cycle economic- and waste law.

The appropriate safety data sheets of the individual products are available on the homepage. The safety data sheets correspond to the standard: ISO 11014-1.

2.5 Interference

Do not mix reagents and solutions from different lots. Consider different transport and storage conditions. Inappropriate handling of test samples or deviations from the test regulation can the results affect. Use no kit components beyond the expiration date. Avoid microbiological contamination of the reagents and the washing water. Consider incubation periods and wash references.

2.6 Precautions

Observe the incubation periods and washing instructions. Never pipette by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin. No smoking, eating or drinking in areas where samples or kit test tubes are handled. When working with kit components or samples, always wear protective gloves and wash your hand thoroughly as soon as you have finished the work. Avoid spraying of any kind. Avoid any skin contact with reagents. Use protective clothing and disposable gloves. All steps have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes. Sodium azide could react with lead and copper tubes and may form highly explosive metal azide. When clearing up, rinse thoroughly with large volumes of water to prevent such formation.

All reagents of this testkit which contain human or animal serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HbsAg and HCV by FDA approved procedures.

All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.

3. Storage and stability

Store the kit and reagents at 2 - 8 °C until expiration date. Do not use components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Do not mix various lots of any kit component within an individual assay.

4.1 Contents of the kit

BA D-0023	REAC-TUBES	Reaction Tubes	2 x 50 tubes	ready for use
BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil	2 x 4	ready for use
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate	2 x 20 mL	Concentrate. Dilute content with dist. water to a final volume of 1000 mL
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate	2 x 12 mL	ready for use, anti-rabbit IgG conjugated with peroxidase
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate	2 x 12 mL	ready for use, containing a solution of
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution	2 x 12 mL	ready for use, containing 0.25 M H ₂ SO ₄
BA E-0131	ADR MN	Adrenaline-Metanephrine Microtiter Strips	1 x 96 wells	12 strips, 8 wells each, break apart, pre-coated, blue coloured
BA E-0231	NAD NMN	Noradrenaline-Normetanephrine Microtiter Strips	1 x 96 wells	12 strips, 8 wells each, break apart, pre-coated, yellow coloured
BA E-8110	MN-AS	Metanephrine Antiserum	1 x 6 mL	from rabbit, ready for use, blue coloured, blue screw cap
BA E-8210	NMN-AS	Normetanephrine Antiserum	1 x 6 mL	from rabbit, ready for use, yellow coloured, yellow screw cap
BA E-8313	ASSAY-BUFF	Assay Buffer	1 x 12 mL	ready for use
BA R-0028	EQUA-REAG	Equalizing Reagent	2 x 10 mL	lyophilized
BA R-8301	STANDARD A	Standard A	1 x 12 mL	ready for use
BA R-8302	STANDARD B	Standard B	1 x 4 mL	ready for use
BA R-8303	STANDARD C	Standard C	1 x 4 mL	ready for use
BA R-8304	STANDARD D	Standard D	1 x 4 mL	ready for use
BA R-8305	STANDARD E	Standard E	1 x 4 mL	ready for use
BA R-8306	STANDARD F	Standard F	1 x 4 mL	ready for use
BA R-8312	ACYL-CONC	Acylation Concentrate	1 x 1.5mL	concentrated
BA R-8351	CONTROL 1	Control 1	1 x 4 mL	ready for use
BA R-8352	CONTROL 2	Control 2	1 x 4 mL	ready for use

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

- Calibrated variable precision micropipettes (e.g. 10-100 µL / 100-1000 µL)
- Microtiter plate washing device
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm
- Centrifuge capable of at least 3.000 x g
- Shaker (shaking amplitude 3mm; approx. 600 rpm)
- Absorbent material (paper towel)
- Distilled water
- Vortex mixer

5. Sample collection and storage

EDTA- or citrate-plasma should be used.
Haemolytic and especially lipemic samples should not be used for the assay.
Storage: up to 6 hours at 2 - 8°C, for longer periods (up to 6 months) at - 20°C.
Repeated freezing and thawing should be avoided.

6. Test procedure

Allow all reagents to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the Reaction Tubes accordingly. Duplicate determinations are recommended.



The precipitation and acylation procedures are identical for both assays and have to be done only once. If samples have to be diluted the Equalizing Reagent (BA R-0028) has to be used.

6.1 Preparation of reagents

Wash Buffer

Dilute the 20 mL Wash Buffer Concentrate with distilled water to a final volume of 1000 mL.
Storage: up to 6 months 4-8°C

Equalizing Reagent

Reconstitute the Equalizing Reagent with 10 mL distilled water.
Reconstituted Equalizing Reagent which is not used immediately has to be stored in aliquots at -20 °C and may be thawed only once.

Acylation Solution

Pipette 80 µL Acylation Reagent Concentrate to 3 mL distilled water and mix thoroughly.
Use immediately!



The Acylation Solution is only stable for a maximum of 3 minutes.

6.2 Precipitation

1. Pipette 100 µL of standards , 100 µL of controls , and 500 µL of plasma samples into the respective Reaction Tubes .
2. Add 500 µL Equalizing Reagent to all tubes containing standards and controls.
3. Add 100 µL Standard A to all tubes containing plasma samples.
4. Mix Reaction Tubes thoroughly (vortex) and centrifuge for 15 minutes at 3,000 x g .
 Take 75 µL of the clear supernatant for the Metanephrine ELISA and 25 µL of the clear supernatant for the Normetanephrine ELISA.

6.3 Metanephrine ELISA

1.	Pipette 50 µL of Assay Buffer into the appropriate wells of the Metanephrine Microtiter Strips .
2.	Pipette 75 µL of the clear supernatant from the standards, controls and samples into the wells.
3.	Pipette 25 µL Acylation Solution (refer to 6.1) into all wells. <i>The Acylation Solution is stable for maximum of only 3 minutes.</i>
4.	Incubate for 15 min at RT (20-25°C) on a shaker (approx. 600 rpm).
5.	Pipette 50 µL of the Metanephrine Antiserum into all wells.
6.	Cover the plate with Adhesive Foil , shake for 1 min at RT (20-25°C) on a shaker and incubate for 15 - 20 hours (overnight) at 2-8°C .
7.	Remove the foil and discard. Discard or aspirate the contents of the wells and wash each well 4 times thoroughly with 300 µL Wash Buffer . Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Pipette 100 µL of the Enzyme Conjugate into all wells.
9.	Incubate for 30 min at RT (20-25°C) on a shaker (approx. 600 rpm).
10.	Discard or aspirate the contents of the wells and wash each well 4 times thoroughly with 300 µL Wash Buffer . Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
11.	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). <i>Avoid exposure to direct sun light!</i>
12.	Add 100 µL of the Stop Solution to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
13.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 450 nm and a reference wavelength between 620 nm and 650 nm.

6.4 Normetanephrine ELISA

1.	Pipette 50 µL of Assay Buffer into the appropriate wells of the Normetanephrine Microtiter Strips .
2.	Pipette 25 µL of the clear supernatant from the standards, controls and samples into the wells.
3.	Pipette 25 µL Acylation Solution (refer to 6.1) into all wells. <i>The Acylation Solution is stable for only 3 minutes.</i>
4.	Incubate for 15 min at RT (20-25°C) on a shaker (approx. 600 rpm).
5.	Pipette 50 µL of the Normetanephrine Antiserum into all wells.
6.	Cover the plate with Adhesive Foil , shake for 1 min at RT (20-25°C) on a shaker and incubate for 15 - 20 hours (overnight) at 2-8°C .
7.	Remove the foil and discard. Discard or aspirate the contents of the wells and wash each well 4 times thoroughly with 300 µL Wash Buffer . Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Pipette 100 µL of the Enzyme Conjugate into all wells.
9.	Incubate for 30 min at RT (20-25°C) on a shaker (approx. 600 rpm).
10.	Discard or aspirate the contents of the wells and wash each well 4 times thoroughly with 300 µL Wash Buffer . Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
11.	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). <i>Avoid exposure to direct sun light!</i>
12.	Add 100 µL of the Stop Solution to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
13.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 450 nm and a reference wavelength between 620 nm and 650 nm.

7. Calculation of results

Standard	Concentration of the standards					
	A	B	C	D	E	F
Normetanephrine (pg/mL)	0	48	160	480	1 600	4 800
Normetanephrine (pmol/L)	0	262	874	2 620	8 740	26 200
Metanephrine (pg/mL)	0	36	120	360	1 200	3 600
Metanephrine (pmol/L)	0	183	608	1 830	6 080	18 300
Conversion:	Normetanephrine (pg/mL) x 5.46 = Normetanephrine (pmol/L) Metanephrine (pg/mL) x 5.07 = Metanephrine (pmol/L)					

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

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 Equalizing Reagent (BA R-0028) and have to be re-assayed.

7.1 Quality control

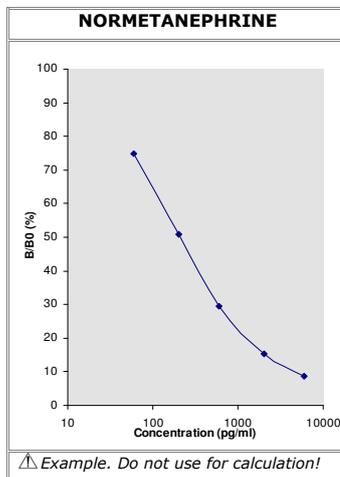
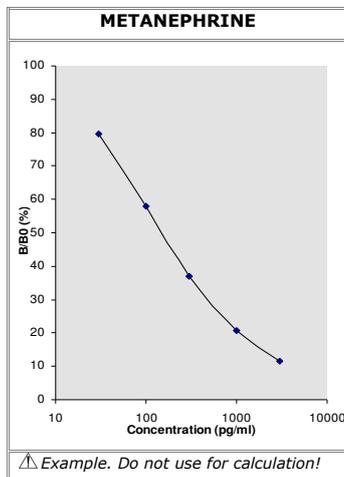
It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. Use controls at both normal and pathological levels. The kit or other commercial controls should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC Report.

7.2 Calibration

The binding of the antisera and the enzyme conjugates and the activity of the enzyme used are temperature dependent, and the extinction values may vary if a thermostat is not used. The higher the temperature, the higher the extinction values will be. The extinction values also depend on the incubation times. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20-25°C.

 *In case of overflow, read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 405 nm*

7.3 Typical calibration curves



8. Assay characteristics

Expected Reference Values	Plasma	Metanephrine < 90 pg/mL	Normetanephrine < 180 pg/mL				
	Plasma	Metanephrine 17 pg/mL	Normetanephrine 23 pg/mL				
Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance		Cross Reactivity (%)				
			Metanephrine	Normetanephrine			
	Derivatized Metanephrine		100	0.08			
	Derivatized Normetanephrine		0.04	100			
	3-Methoxytyramin.HCl		< 0.001	1,74			
	Adrenaline		< 0.001	< 0.001			
	Noradrenaline		< 0.001	< 0.001			
	Dopamin.HCl		< 0.001	< 0.001			
	VMS		< 0.001	< 0.001			
	HMVS		< 0.001	< 0.001			
	L-DOPA		< 0.001	< 0.001			
	L-Tyrosin		< 0.001	< 0.001			
Tyramine.HCl		< 0.001	< 0.001				
Normetanephrine		< 0.001	< 0.001				
Acetaminophen		< 0.001	< 0.001				
Precision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Sample	Range (pg/mL)	CV (%)		Sample	Range (pg/mL)	CV (%)
Metanephrine	1	155 ± 17	11	Metanephrine	1	133 ± 13	10
	2	245 ± 28	11		2	257 ± 23	8.9
	3	523 ± 38	7.3		3	528 ± 50	9.5
Normetanephrine	1	167 ± 12	7.3	Normetanephrine	1	161 ± 18	11
	2	373 ± 29	7.8		2	370 ± 19	5.1
	3	832 ± 60	7.2		3	844 ± 51	6.0
Linearity			Range	Serial dilution up to		Range (%)	
	Metanephrine	Plasma	41 – 2100	1: 65		109	
	Normetanephrine	Plasma	58 – 5800	1: 129		109	
Recovery			Mean (%)	Range (%)		% Recovery after spiking	
	Metanephrine	Plasma	97	85 – 111			
	Normetanephrine	Plasma	92	80 – 108			
Method Comparison: ELISA vs. LC-MS/MS	Metanephrine	Plasma	LC-MS/MS = 1.1x - 19.4	r = 0.98; n = 59			
	Normetanephrine	Plasma	LC-MS/MS = 1.2x + 10.5	r = 0.99; n = 59			

 **For updated literature, information about clinical significance 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		For research use only!

Version: 11.0

Effective: October 17, 2013

7/7

Danksagung

Besonderer Dank gilt
Herrn Prof. Dr. med. M. Fassnacht
für die Möglichkeit der Promotion.

Größter Dank gebührt meinem Doktorvater
Herrn Priv.-Doz. Dr. med. D. Weismann
für die Überlassung des Themas und die umfassende Expertise.

Herrn Prof. Dr. med. G. Eisenhofer
und den Mitarbeitern der teilnehmenden Zentren
für die Kooperation.

Den Mitarbeitern und Doktoranden des Schwerpunktes Endokrinologie
der Universitätsklinik Würzburg,
insbesondere Till Bergen,
für die gute Zusammenarbeit und Kollegialität.

Meinen Eltern
für die Ermöglichung meines Studiums und die stetige Unterstützung.