

Product information



Information about other products is available at: www.demeditec.com



Metanephrine Urine ELISA



DEE8400



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

Table of contents

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

1.	Einleitung	14
1.1	Verwendungszweck und Testprinzip	14
1.2	Klinische Anwendung	14
2.	Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen	14
2.1	Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen	14
2.2	Grenzen des Tests	15
2.2.1	Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben	15
2.2.2	Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel	15
2.2.3	High-Dose-Hook Effekt	15
3.	Lagerung und Haltbarkeit	15
4.	Materialien	16
4.1	Reagenzien im Kit	16
4.2	Kalibratoren und Kontrollen	17
4.3	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien	17
4.4	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte	17
5.	Probensammlung, -behandlung und -lagerung	17
6.	Testdurchführung	17
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise	18
6.2	Probenvorbereitung	18
6.3	Metanephrine ELISA	19
7.	Berechnung der Ergebnisse	19
7.1	Erwartete Referenzbereiche	20
7.2	Typische Standardkurve	20
8.	Kontrollproben	20
9.	Assaycharakteristika	20
9.1	Leistungsdaten	20
10.	Referenzen/Literatur	21
11.	Änderungen	21

Índice

1.	Introducción	22
1.1	Uso previsto y principio de la prueba	22
1.2	Aplicación clínica	22
2.	3. Precauciones de procedimiento, directrices, advertencias y limitaciones	22
2.1	Precauciones de procedimiento, directrices y advertencias	22
2.2	Limitaciones	23
2.2.1	Sustancias interferentes y manipulación adecuada de las muestras	23
2.2.2	Interferencias medicamentosas y alimentarias	23
2.2.3	Efecto de alta dosis-gancho	23
3.	Almacenamiento y estabilidad	23
4.	Materiales	24
4.1	Contenido del kit	24
4.2	Calibración y controles	25
4.3	Materiales adicionales necesarios pero no incluidos en el kit	25
4.4	Equipamiento adicional necesario pero no incluido en el kit	25
5.	Recogida, manipulación y almacenamiento de muestras	25
6.	Procedimiento de ensayo	25
6.1	Preparación de reactivos y notas complementarias	26
6.2	Preparación de las muestras	26
6.3	Metanefrina ELISA	26
7.	Cálculo de resultados	27
7.1	Valor de referencia previsto	27
7.2	Curva estándar típica	28
8.	Muestras de control	28
9.	Características del ensayo	28
9.1	Datos de rendimiento	28
10.	Referencias/Literatura	29
11.	Cambios	29
	 SÍMBOLOS UTILIZADOS CON LOS ENSAYOS DEMEDITEC	 30

Spis treści:

1.	Wprowadzenie	31
1.1	Przeznaczenie i zasada działania testu	31
1.2	Aplikacja kliniczna	31
2.	Ograniczenia, środki ostrożności i uwagi ogólne	31
2.1	Środki ostrożności i uwagi ogólne	31
2.2	Ograniczenia	32
2.2.1	Substancje powodujące interferencje i prawidłowe postępowanie z próbkami	33
2.2.2	Leki i żywność powodujące interferencje	33
2.2.3	Efekt wysokiej dawki	33
3.	Przechowywanie i stabilność	33
4.	Materiały	33
4.1	Zawartość zestawu	33
4.2	Standardy i kontrole	34
4.3	Dodatkowe materiały wymagane, ale niedostarczone z zestawem	34
4.4	Dodatkowe wyposażenie wymagane, ale niedostarczane z zestawem	34
5.	Pobieranie i przechowywanie próbek	35
6.	Procedura	35
6.1	Przygotowanie odczynników i dalsze uwagi	35
6.2	Przygotowanie próbek	36
6.3	Metanefryna ELISA	36
7.	Obliczanie wyników	37
7.1	Oczekiwane wartości referencyjne	37
7.2	Typowa krzywa kalibracyjna	38
8.	Próbki kontrolne	38
9.	Cechy zestawu	39
9.1	Wydajność	39
10.	Literatura	40
11.	Zmiany	40
	SYMBOLE	40

Related Products:

- Nephtrines Urine ELISA
- Normetanephrine Urine ELISA

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

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Metanephrine in urine.

During the sample preparation Metanephrine (Metadrenaline) is quantitatively acylated.

The subsequent competitive ELISA uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The acylated standards, controls and samples compete with the solid phase bound analytes for a fixed number of antibody binding sites. After the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antibody complexes are removed by washing. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate resulting in a colour reaction. The reaction is monitored at a wavelength of 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standard concentrations. Manual processing of the ELISA is recommended. The use of automatic laboratory equipment is the responsibility of the user. This in-vitro diagnostic is for professional use only.

1.2 Clinical application

Metanephrine and Normetanephrine are the metabolites of the catecholamines Epinephrine and Norepinephrine, respectively. They are metabolized to Vanillylmandelic acid or excreted with the urine. Patients with pheochromocytoma or other tumors derived from neuroendocrine cells show elevated urinary levels of total Metanephrines.

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

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone, even if these results are assessed in accordance with the quality criteria of the method. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of the patient.

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

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

- (1) This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and must be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for a certain type of sample as indicated in Intended Use (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) must be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) If serious incidents should occur in connection with this product, they should be reported to the manufacturer and the competent national authorities.
- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 – 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided. Microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up.
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended.
- (9) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials, and devices are prepared for use at the appropriate time.
- (10) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (11) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (12) A standard curve must be established for each run.
- (13) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report provided with the kit.

- (14) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (15) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (16) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Rinse contaminated items before reuse.
- (17) For information about hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (18) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.
- (19) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (20) In case of any severe damage to the test kit or components, the manufacturer has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components must not be used for a test run. They must be stored properly until the manufacturer decides what to do with them. If it is decided that they are no longer suitable for measurements, they must be disposed of in accordance with national regulations.
- (21) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but must be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.

2.2 Limitations

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

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

2.2.1 Interfering substances and proper handling of specimens

24-hour urine

Please note the sample collection! If the percentage of the final concentration of acid is too high, this will lead to incorrect results for the urine samples.

2.2.2 Drug and food interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of Metanephrine level in the sample.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

Store kit and reagents at 2 – 8 °C until expiration date. Do not use kit and components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened, the reagents are stable for 2 months when stored at 2 – 8 °C. Once the resealable pouch of the ELISA plate has been opened, care should be taken to close it tightly again including the desiccant.

4. Materials

4.1 Contents of the kit

BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate – concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, purple cap	
BA E-0045	CONJUGATE	Enzyme Conjugate – ready to use
Content:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
Description:	Species is goat	

BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate – ready to use
Content:	Chromogenic substrate containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 ml/vial, black cap	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution – ready to use
Content:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 ml/vial, grey cap	
BA E-0131	U ADR MN	Metanephrine Microtiter Strips – ready to use
Content:	1 x 96 wells (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable blue pouch with desiccant	
BA E-8410	MN-AS	Metanephrine Antiserum – ready to use
Content:	Rabbit anti-metanephrine antibody in buffer with proteins and non-mercury preservative, blue coloured	
Volume:	1 x 12 ml/vial, blue cap	
Description:	Species of antibody is rabbit, species of protein in buffer is bovine	
BA R-0012	ACYL-CONC	Acylation Concentrate – concentrated
Content:	Concentrated acylation reagent	
Volume:	1 x 0.5 ml/vial, white cap	
Hazard pictograms:		
	GHS07	
Signal word:	Warning	
Hazard statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.	
Precautionary statements:	P261 Avoid breathing mist/vapours/spray. P280 Wear protective gloves. P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. P362+P364 Take off contaminated clothing and wash it before reuse. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.	
BA R-0075	ACYL-DILUENT	Acylation Diluent – ready to use
Content:	Dimethylsulfoxide	
Volume:	1 x 3.5 ml/vial, white cap	
BA R-8611	ACYL-BUFF	Acylation Buffer – ready to use
Content:	TRIS buffer	
Volume:	1 x 30 ml/vial, white cap	
BA R-8619	HCL	Hydrochloric Acid – ready to use
Content:	0.25 M hydrochloric acid, yellow coloured	
Volume:	1 x 30 ml/vial, green cap	

4.2 Calibration and Controls

Standards and Controls – ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration [ng/ml] (= µg/l) MN	Concentration [nmol/l] MN	Volume/ Vial
BA R-8601	STANDARD A	white	0	0	4 ml
BA R-8602	STANDARD B	yellow	20	101	4 ml
BA R-8603	STANDARD C	orange	60	304	4 ml
BA R-8604	STANDARD D	blue	200	1,014	4 ml
BA R-8605	STANDARD E	grey	600	3,042	4 ml
BA R-8606	STANDARD F	black	2,000	10,140	4 ml
BA R-8651	CONTROL 1	green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range.		4 ml
BA R-8652	CONTROL 2	red			4 ml

Conversion: metanephrine [ng/ml] x 5.07 = metanephrine [nmol/l]

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

4.3 Additional materials required but not provided in the kit

- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Absorbent material (paper towel)
- Reaction tubes, at least 3 ml, Polypropylene/Polystyrol

4.4 Additional equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 – 600 µl; 1.2 – 3 ml
- Microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 – 650 nm
- Vortex mixer
- Temperature controlled water bath (90 °C) or similar heating device

⚠ The assay can be performed with or without shaking. If a microtiter plate shaker is used, it should have the following characteristics: shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm.

5. Sample collection, handling and storage

24-hour urine, collected in a bottle containing 10 – 15 ml of 6 M HCl, should be used.

Determine the total volume of urine excreted during a period of 24 h for calculation of the results.

Storage: up to 5 days at 2 – 8 °C, for longer periods (up to 6 months) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided. Avoid exposure to direct sunlight.

6. Test procedure

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the reaction tubes and microwell plates (Microtiter Strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up). Duplicate determinations are recommended.

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. Varying incubation times will have similar influences on the absorbance. The optimal temperature during the enzyme immunoassay is between 20 – 25 °C.

6.1 Preparation of reagents and further notes

Wash Buffer

Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate **WASH-CONC** **50X** with water to a final volume of 1000 ml.

Storage: 2 months at 2 – 8 °C

Acylation Solution

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

Dilute the **ACYL-CONC** (BA R-0012) 1 + 60 with **ACYL-DILUENT** (BA R-0075) in a glass or polypropylene-vial.

ACYL-CONC (BA R-0012)	10 µl	15 µl	25 µl	50 µl
ACYL-DILUENT (BA R-0075)	600 µl	900 µl	1.5 ml	3 ml

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

Metanephrine Microtiter Strips

In rare cases residues of the blocking and stabilizing reagent can be seen in the wells as small, white dots or lines. These residues do not influence the quality of the product.

6.2 Preparation of samples

Hydrolysis

1. Pipette **25 µl** of **standards, controls, and urine samples** into the respective reaction tubes.
2. Add **250 µl** **HCL** to all tubes.
3. Mix thoroughly (vortex) and hydrolyze for **30 min** at **90 °C**.
4. Cool down the tubes to room temperature.

Acylation

1. Pipette **250 µl** of **ACYL-BUFF** into all tubes.
 2. Add **25 µl** of **Acylation Solution** (refer to 6.1) to all tubes.
 3. Mix thoroughly (vortex) and acylate for **15 min** at **RT** (20 – 25 °C).
 4. Add **2.5 ml water** (deionized, distilled, or ultra-pure) to all tubes.
- ⚠ Take **25 µl** of the acylated **standards, controls and urine samples** for the **Metanephrine ELISA**.

6.3 Metanephrine ELISA

The usage of a shaker is not mandatory. The alternative protocol without shaker is highlighted in italic and shaded in grey.

1. Pipette **25 µl** of the **acylated standards, controls and samples** into the appropriate wells of the **Metanephrine Microtiter Strips** **ADR MN**.
2. Pipette **100 µl** of the **MN-AS** into all wells.
3. Incubate **30 min** at **RT** (20 – 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
*Without usage of a shaker: shake the Metanephrine Microtiter Strips **ADR MN** shortly by hand and incubate for 1 h at RT (20 – 25 °C).*
4. Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate **3 x** by adding **300 µl** of **Wash Buffer**, **discarding** the content and **blotting dry each time** by tapping the inverted plate on absorbent material.
5. Pipette **100 µl** of the **CONJUGATE** into all wells.
6. Incubate for **15 min** at **RT** (20 – 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
Without usage of a shaker: incubate for 15 min at RT (20 – 25 °C).
7. Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate **3 x** by adding **300 µl** of **Wash Buffer**, **discarding** the content and **blotting dry each time** by tapping the inverted plate on absorbent material.
8. Pipette **100 µl** of the **SUBSTRATE** into all wells.
9. Incubate for **15 ± 2 min** at **RT** (20 – 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
Without usage of a shaker: incubate for 15 min ± 2 at RT (20 – 25 °C).
- ⚠ **Avoid exposure to direct sunlight!**
10. Add **100 µl** of the **STOP-SOLN** to all wells and shake the microtiter plate shortly.
11. **Read** the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to **450 nm** (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

7. Calculation of results

Measuring range	Metanephrine
	10.5 – 2,000 ng/ml

The standard curve, which can be used to determine the concentration of the unknown samples, is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis) using a concentration of 0.001 ng/ml for Standard A (this alignment is mandatory because of the logarithmic presentation of the data). Use non-linear regression for curve fitting (e. g. 4-parameter, marquardt).

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

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

The amount of analyte excreted per day [µg/day] is calculated according to:

concentration of the sample [in µg/l] x volume of urine excreted per day [in l/day]

Example

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

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

Samples found with concentrations higher than the highest standard (Standard F) should be diluted accordingly with Standard A and must be re-assayed.

Conversion:

Metanephrine [ng/ml] x 5.07 = Metanephrine [nmol/l]

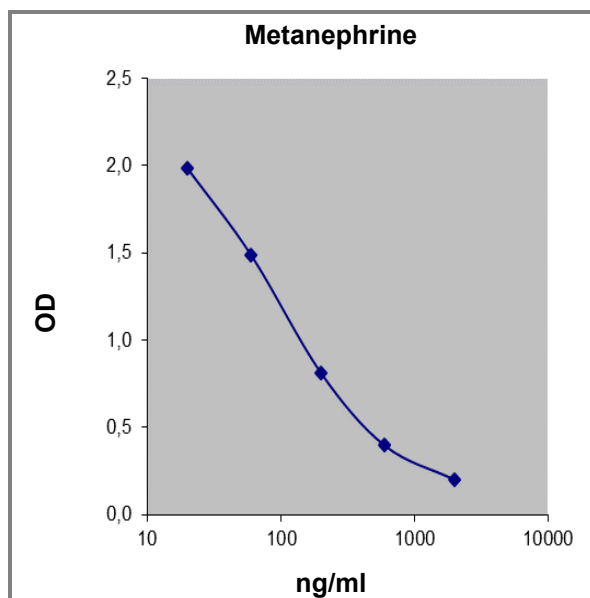
7.1 Expected reference value

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

	Metanephrine
24-hour urine	< 350 µg/day

7.2 Typical standard curve

⚠ *Example: Do not use for calculation!*



8. Control samples

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. Commercially obtained control samples should be treated like unknown samples. Control samples should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC-Report.

9. Assay characteristics**9.1 Performance data**

Analytical Sensitivity	
	Metanephrine
Limit of Blank (LOB)	6.0 ng/ml
Limit of Detection (LOD)	8.6 ng/ml
Limit of Quantification (LOQ)	10.5 ng/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	
Substance	Cross Reactivity [%]
	Metanephrine
Derivatized Metanephrine	100
Derivatized Normetanephrine	0.15
Derivatized 3-methoxytyramine	< 0.01
Adrenaline	3.3
Noradrenaline	< 0.01
Dopamine	< 0.01
Vanillic mandelic acid, L-Dopa, Homovanillic acid, L-Tyrosin, Tyramin	< 0.01

Precision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Sample	Range [ng/ml]	CV [%]		Sample	Range [ng/ml]	CV [%]
Metanephrine	1	34.4 ± 3.1	9	Metanephrine	1	32.8 ± 5.4	16
	2	59.8 ± 5.1	9		2	57.2 ± 9.0	16
	3	141 ± 13.8	10		3	144 ± 25.0	17
	4	575 ± 71.4	12		4	394 ± 64.1	16

Recovery			
	Range [ng/ml]	Mean [%]	Range [%]
Metanephrine	20.2 – 1,484	97	85 – 113

Linearity			
	Serial dilution up to	Mean [%]	Range [%]
Metanephrine	1:64	102	94 – 115

Method Comparison: ELISA vs. HPLC*		
Metanephrine	HPLC = 0.9 ELISA – 0.8	r = 0.99; n = 40
* The concentrations were assessed using both the ELISA and the HPLC method (external QC samples from UK NEQAS). The correlation between ELISA and HPLC is excellent. Please take in mind, that the UK control values are the mean of about 40 different HPLC users and contain always one pathological sample per sending.		

10. References/Literature

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

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

11. Changes

Version	Release Date	Chapter	Change
17.0	2023-10-24	4.1 4.1 4.3	- BA D-0023 Reaction Tubes removed - Hazard labelling updated according to SDS - Reaction Tubes listed as additional material

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta

Zugehörige Produkte:

- Nephtrines Urine ELISA
- Normetanephrine Urine ELISA

1. Einleitung**1.1 Verwendungszweck und Testprinzip**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Metanephrin in Urin.

Während der Probenvorbereitung wird Metanephrin zu seinem entsprechenden N-Acyl-Derivat umgewandelt.

Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an die feste Phase der Mikrotiterplatte gebunden. Die acylierten Standards, Kontrollen und Proben und die an die Festphase gebundenen Analyten konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörperkomplexe durch Waschen entfernt. Der an die feste Phase gebundene Antikörper wird mit einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen Antikörper gebunden und mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Konzentrationen der unbekannten Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen und Abgleich der gemessenen Absorptionen ermittelt. Die manuelle Abarbeitung des ELISAs wird empfohlen. Die Verwendung von automatischen Laborgeräten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Dieses In-Vitro-Diagnostikum ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

1.2 Klinische Anwendung

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

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

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

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

- (1) Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Gebrauchsanweisung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter Verwendungszweck (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (4) Geeignete persönliche Schutzausrüstung (Kittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille) ist zu tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Falls in Zusammenhang mit diesem Produkt schwerwiegende Vorfälle auftreten sollten, sollen diese dem Hersteller und den zuständigen nationalen Behörden gemeldet werden.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Verwenden Sie für Verdünnungs- oder Rekonstitutionszwecke deionisiertes, destilliertes oder ultrareines Wasser. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über einzeln herausnehmbare und abbrechbare Streifen. Ungenutzte Wells müssen bei 2 – 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden. Die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden.
- (8) Proben sollten in Doppelbestimmung gemessen werden.
- (9) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.

- (10) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Wells sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (11) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (12) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (13) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen der Kitkontrollen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (14) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (15) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (16) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (17) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe das Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (18) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potentiell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
- (19) Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (20) Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen sachgerecht gelagert werden, bis der Hersteller entscheidet, wie mit ihnen zu verfahren ist. Sollte entschieden werden, dass sie für Messungen nicht mehr geeignet sind, müssen sie entsprechend den nationalen Richtlinien entsorgt werden.
- (21) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.

2.2 Grenzen des Tests

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

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

2.2.1 Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben

24-Stunden Sammelurin

Probensammlung beachten! Ist der Säuregehalt des 24-Stunden Sammelurins zu hoch, führt dies zu falschen Ergebnissen der Urinproben.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel

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

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Das Kit muss bei 2 – 8 °C bis zum Verfalldatum gelagert werden. Das Kit und die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfalldatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 2 Monate stabil, wenn sie bei 2 – 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel der ELISA-Platte sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien**4.1 Reagenzien im Kit**

BA E-0030	WASH-CONC 50x	Waschpufferkonzentrat – 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel lila	
BA E-0045	CONJUGATE	Enzymkonjugat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege anti-Kaninchen Immunglobuline, konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot	
Beschreibung:	Spezies ist Ziege	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stopplösung – gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel grau	
BA E-0131	LI ADR MN	Metanephrin Mikrotiterstreifen – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Wells (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem blauen wiederverschließbaren Beutel	
BA E-8410	MN-AS	Metanephrin Antiserum – gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen anti-Metanephrin Antikörper im Proteinpuffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel, blau gefärbt	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel blau	
Beschreibung:	Spezies vom Antikörper ist Kaninchen, Spezies vom Protein im Puffer ist Rind	
BA R-0012	ACYL-CONC	Acylation Concentrate – konzentriert
Inhalt:	Konzentriertes Azylierungsreagenz	
Volumen:	1 x 0,5 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
Gefahren- piktogramme:	 GHS07	
Signalwort:	Achtung	
Gefahren- hinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.	
Sicherheits- hinweise:	P261 Einatmen von Nebel, Aerosol, Dampf vermeiden. P280 Schutzhandschuhe tragen. P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P362+P364 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
BA R-0075	ACYL-DILUENT	Acylation Diluent – gebrauchsfertig
Inhalt:	Dimethylsulfoxid	
Volumen:	1 x 3,5 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
BA R-8611	ACYL-BUFF	Acylation Buffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	TRIS-Puffer	
Volumen:	1 x 30 ml/Fläschchen, Deckel weiß	

BA R-8619 **HCL** **Hydrochloric Acid** – gebrauchsfertig

Inhalt: 0,25 M Salzsäure, gelb gefärbt

Volumen: 1 x 30 ml/Fläschchen, Deckel grün

4.2 Kalibratoren und Kontrollen**Standards und Kontrollen** – gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration [ng/ml] (= µg/l) MN	Konzentration [nmol/l] MN	Volumen/ Fläschchen
BA R-8601	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA R-8602	STANDARD B	gelb	20	101	4 ml
BA R-8603	STANDARD C	orange	60	304	4 ml
BA R-8604	STANDARD D	blau	200	1.014	4 ml
BA R-8605	STANDARD E	grau	600	3.042	4 ml
BA R-8606	STANDARD F	schwarz	2.000	10.140	4 ml
BA R-8651	CONTROL 1	grün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Vertrauensbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.		4 ml
BA R-8652	CONTROL 2	rot			4 ml

Umrechnung: Metanephrin [ng/ml] x 5,07 = Metanephrin [nmol/l]

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

4.3 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien

- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- Saugfähige Unterlage
- Reaktionsröhrchen, Mindestvolumen 3 ml, Polypropylen/Polystyrol

4.4 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 – 600 µl; 1,2 – 3 ml
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer mit 450 nm und, wenn möglich, 620 – 650 nm Filter zur Auswertung von Mikrotiterplatten
- Vortex-Mischer
- Temperaturkontrolliertes Wasserbad (90 °C) oder ähnliche Heizvorrichtung

⚠ *Der Assay kann ohne Verwendung eines Mikrotiterplattenschüttlers durchgeführt werden. Wird jedoch ein Schüttler verwendet, sollte dieser folgende Charakteristika haben: Amplitude 3 mm; ca. 600 rpm.*

5. Probensammlung, -behandlung und -lagerung

Es sollte 24-Stunden Urin, der in einem Gefäß mit 10 – 15 ml 6 M HCl gesammelt wurde, verwendet werden.

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

Lagerung: bis zu 5 Tage bei 2 – 8 °C, für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C. Direktes Sonnenlicht vermeiden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Reaktionsröhrchen und Mikrotiterplatten müssen beschriftet werden (die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden). Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.

Die Bindung des Antikörpers, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassays liegt zwischen 20 – 25 °C.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC** **50X** mit Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

Acylierungslösung

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

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

ACYL-CONC (BA R-0012)	10 µl	15 µl	25 µl	50 µl
ACYL-DILUENT (BA R-0075)	600 µl	900 µl	1,5 ml	3 ml

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

Metanephryn Mikrotiterstreifen

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

6.2 Probenvorbereitung

Hydrolyse

1. Jeweils **25 µl** der **Standards, Kontrollen** und **Urinproben** in die entsprechenden Reaktionsröhrchen pipettieren.
2. **250 µl** **HCL** in alle Reaktionsröhrchen hinzufügen.
3. Die Reaktionsröhrchen sorgfältig mischen (Vortex) und **30 Min** bei **90 °C** inkubieren.
4. Die Reaktionsröhrchen auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

Azylierung

1. Jeweils **250 µl** **ACYL-BUFF** in alle Reaktionsröhrchen pipettieren.
 2. **25 µl Azylierungslösung** (siehe 6.1) in alle Reaktionsröhrchen pipettieren.
 3. Sorgfältig mischen (Vortex) und für **15 Min** bei **RT** (20 – 25 °C) inkubieren.
 4. **2,5 ml Wasser** (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in alle Reaktionsröhrchen hinzufügen.
- ⚠ Jeweils **25 µl** der **azylierten Standards, Kontrollen** und **Urinproben** werden für den nachfolgenden **Metanephrine ELISA** benötigt.

6.3 Metanephrine ELISA

Die Verwendung eines Schüttlers ist nicht unbedingt erforderlich. Die alternativen Inkubationszeiten ohne Schüttler sind jeweils in kursiver Schreibweise vermerkt und grau hinterlegt.

1.	Jeweils 25 µl der azylierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells der Metanephtrin Mikrotiterstreifen W ADR MN pipettieren.
2.	Jeweils 100 µl MN-AS in alle Wells pipettieren.
3.	Platte 30 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. (oder kurz per Hand schütteln und 1 Stunde bei RT (20 – 25 °C) ohne Schüttler inkubieren).
4.	Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells 3-mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5.	Jeweils 100 µl CONJUGATE in alle Wells pipettieren.
6.	Für 15 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. (oder 15 Minuten bei RT (20 – 25 °C) ohne Schüttler inkubieren).
7.	Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells 3-mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8.	Jeweils 100 µl SUBSTRATE in alle Wells pipettieren.
9.	Für 15 ± 2 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. (oder 15 ± 2 Min bei RT (20 – 25 °C) ohne Schüttler inkubieren).
⚠	Direktes Sonnenlicht vermeiden!
10.	100 µl STOP-SOLN in alle Wells pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
11.	Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620 – 650 nm) innerhalb von 10 Minuten messen .

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Metanephtrin
	10,5 – 2.000 ng/ml

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannten Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standardabsorptionen (Berechnung der mittleren Absorption, linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) mit einer Konzentration von 0,001 ng/ml für Standard A (diese Ausrichtung ist aufgrund der logarithmischen Darstellung der Daten erforderlich) erstellt. Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z. B.: 4-parameter, marquardt) verwendet.

⚠ *Dieser Assay ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die OD-Werte mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. OD-Signale, die unterhalb der Standardkurve liegen, entsprechen einer sehr hohen Konzentration des Analyten in der gemessenen Probe und müssen als positiv gewertet werden.*

Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

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

Aus der Standardkurve abgelesene Konzentration der Probe [in µg/l] x Tagesmenge Urin [in l/Tag]

Beispiel

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

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

Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (Standard F) gefunden werden, müssen entsprechend mit Standard A verdünnt und nochmals bestimmt werden.

Umrechnung:

Metanephtrin [ng/ml] x 5,07 = Metanephtrin [nmol/l]

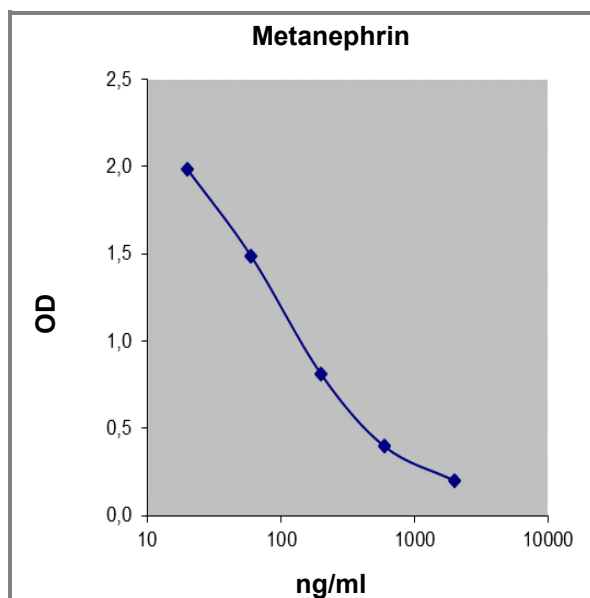
7.1 Erwartete Referenzbereiche

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

	Metanephrin
Sammelurin	< 350 µg/Tag

7.2 Typische Standardkurve

⚠ *Beispiel: Bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



8. Kontrollproben

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen Vorschriften zu verwenden. Verwenden Sie Kontrollen im normalen und pathologischen Bereich. Kommerzielle Kontrollproben müssen dabei wie die unbekannten Proben behandelt werden. Kontrollproben sollten innerhalb der festgelegten Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report angegeben.

9. Assaycharakteristika

9.1 Leistungsdaten

Analytische Sensitivität	
	Metanephrin
Limit of Blank (LOB)	6,0 ng/ml
Limit of Detection (LOD)	8,6 ng/ml
Limit of Quantification (LOQ)	10,5 ng/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)	
Substanz	Kreuzreaktion [%]
	Metanephrin
Derivatisiertes Metanephrin	100
Derivatisiertes Normetanephrin	0,15
Derivatisiertes 3-Methoxytyramin	< 0,01
Adrenalin	3,3
Noradrenalin	< 0,01
Dopamin	< 0,01
Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure, L-Dopa, L-Tyrosin, Tyramin	< 0,01

Präzision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Probe	Bereich [ng/ml]	CV [%]		Probe	Bereich [ng/ml]	CV [%]
Metanephrin	1	34,4 ± 3,1	9	Metanephrin	1	32,8 ± 5,4	16
	2	59,8 ± 5,1	9		2	57,2 ± 9,0	16
	3	141 ± 13,8	10		3	144 ± 25,0	17
	4	575 ± 71,4	12		4	394 ± 64,1	16

Wiederfindung			
	Bereich [ng/ml]	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Metanephrin	20,2 – 1.484	97	85 – 113

Linearität			
	Serielle Verd. bis	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Metanephrin	1:64	102	94 – 115

Methodenvergleich: ELISA vs. HPLC		
Metanephrin	HPLC = 0.9 ELISA – 0.8	r = 0.99; n = 40
* Die Werte wurden mit der ELISA- und HPLC-Methode (externe QC-Proben von UK-NEQUAS) bestimmt. Die Korrelation zwischen ELISA und HPLC ist ausgezeichnet. Es ist zu beachten, dass die UK-NEQUAS Kontrollwerte dem Mittelwert der von ca. 40 verschiedenen HPLC-Anwendern angegebenen Werte entsprechen und immer eine pathologische Probe pro Aussendung enthalten.		

10. Referenzen/Literatur

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

Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anfrage von Ihrem Anbieter gerne zur Verfügung gestellt.

11. Änderungen

Version	Freigabedatum	Kapitel	Änderung
17.0	2023-10-24	4.1 4.1 4.3	- BA D-0023 Reaction Tubes entfernt - Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert - Reaktionsröhrchen als Zusatzmaterial aufgeführt

Productos relacionados:

- Nefrinas Orina ELISA
- Normetanefrina orina ELISA

1. Introducción**1.1 Uso previsto y principio de la prueba**

Enzimoimmunoensayo para la determinación cuantitativa de Metanefrina en orina.

Durante la preparación de la muestra, la metanefrina (metadrenalina) es cuantitativamente acilada.

El ELISA competitivo posterior utiliza el formato de placa de microtitulación. El antígeno se une a la fase sólida de la placa de microtitulación. Los estándares acilados, los controles y las muestras compiten con los analitos unidos a la fase sólida por un número fijo de sitios de unión de anticuerpos. Una vez que el sistema está en equilibrio, el antígeno libre y los complejos antígeno-anticuerpo libres se eliminan mediante lavado. El anticuerpo unido a la fase sólida se detecta mediante un conjugado IgG-peroxidasa anti-conejo utilizando TMB como sustrato, lo que da lugar a una reacción de color. La reacción se controla a una longitud de onda de 450 nm.

La cuantificación de muestras desconocidas se consigue comparando su absorbancia con una curva de referencia preparada con concentraciones estándar conocidas. Se recomienda el procesamiento manual del ELISA. El uso de equipos automáticos de laboratorio es responsabilidad del usuario. Este diagnóstico in vitro es sólo para uso profesional.

1.2 Aplicación clínica

La metanefrina y la normetanefrina son los metabolitos de las catecolaminas epinefrina y norepinefrina, respectivamente. Se metabolizan en ácido vanililmandélico o se excretan con la orina.

Los pacientes con feocromocitoma u otros tumores derivados de células neuroendocrinas muestran niveles urinarios elevados de Metanefrinas totales.

Dado que la secreción de catecolaminas de las células neuroendocrinas puede presentar grandes variaciones, se utilizan muestras de orina recogidas durante un periodo de 24 horas para promediar estas fluctuaciones.

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse únicamente en los resultados de laboratorio, aunque estos resultados se evalúen de acuerdo con los criterios de calidad del método. Cualquier resultado de laboratorio es sólo una parte del cuadro clínico total del paciente.

Sólo en los casos en que los resultados de laboratorio concuerdan de forma aceptable con el cuadro clínico general del paciente, puede utilizarse para consecuencias terapéuticas.

2. Precauciones de procedimiento, directrices, advertencias y limitaciones**2.1 Precauciones de procedimiento, directrices y advertencias**

- (22) Este kit está destinado exclusivamente a uso profesional. Los usuarios deben tener un conocimiento profundo de este protocolo para el uso exitoso de este kit. Sólo son válidas las instrucciones de ensayo suministradas con el kit y deben utilizarse para realizar el ensayo. Sólo se obtendrá un rendimiento fiable si se siguen estricta y cuidadosamente las instrucciones proporcionadas.
- (23) Este ensayo ha sido validado para un determinado tipo de muestra, tal y como se indica en Uso previsto (consulte el Capítulo 1). Cualquier uso no indicado de este kit es responsabilidad del usuario y el fabricante no se hace responsable.
- (24) Deben seguirse los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).
- (25) Para reducir la exposición a sustancias potencialmente nocivas, utilice batas de laboratorio, guantes de protección desechables y gafas protectoras cuando sea necesario.
- (26) Si se producen incidentes graves relacionados con este producto, deben comunicarse al fabricante y a las autoridades nacionales competentes.
- (27) Todos los reactivos del kit y las muestras deben llevarse a temperatura ambiente y mezclarse suavemente pero a fondo antes de su uso. Para la dilución o reconstitución, utilice agua desionizada, destilada o ultrapura. Evite congelar y descongelar repetidamente los reactivos y las muestras.
- (28) La microplaca contiene tiras a presión. Los pocillos no utilizados deben almacenarse a 2 - 8° C en la bolsa de aluminio sellada con desecante y utilizarse en el marco suministrado. Las tiras de microtitulación que se retiren del marco para su uso deben marcarse como corresponde para evitar cualquier confusión.
- (29) Se recomienda encarecidamente determinar la muestra por duplicado.
- (30) Una vez iniciada la prueba, todos los pasos deben completarse sin interrupción. Asegúrese de que los reactivos, materiales y dispositivos necesarios están preparados para su uso en el momento adecuado.
- (31) Los tiempos de incubación influyen en los resultados. Todos los pocillos deben manipularse en el mismo orden e intervalos de tiempo.

- (32) Para evitar la contaminación cruzada de reactivos, utilice puntas de pipeta desechables nuevas para dispensar cada reactivo, muestra, estándar y control.
- (33) Debe establecerse una curva estándar para cada serie.
- (34) Los controles deben incluirse en cada serie y estar dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza figuran en el informe de control de calidad suministrado con el kit.
- (35) No mezcle componentes del kit con números de lote diferentes dentro de una misma prueba y no utilice reactivos cuya fecha de caducidad supere la indicada en las etiquetas del kit.
- (36) Evite el contacto con la solución de parada que contiene 0,25 M H₂ SO₄. Puede causar irritación de la piel y quemaduras. En caso de contacto con los ojos o la piel, aclarar inmediatamente con agua.
- (37) El sustrato TMB tiene un efecto irritante sobre la piel y las mucosas. En caso de posible contacto, lavar los ojos con abundante volumen de agua y la piel con jabón y abundante agua. Aclarar los objetos contaminados antes de reutilizarlos.
- (38) Para obtener información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit, consulte la ficha de datos de seguridad (FDS). La ficha de datos de seguridad de este producto está disponible directamente en el sitio web del fabricante o previa solicitud.
- (39) Los reactivos del kit deben considerarse residuos peligrosos y eliminarse de acuerdo con la normativa nacional.
- (40) Los valores de referencia esperados que se indican en estas instrucciones de ensayo son sólo indicativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.
- (41) En caso de que el kit de ensayo o sus componentes presenten daños graves, deberá informarse al fabricante por escrito, a más tardar una semana después de recibir el kit. Los componentes individuales gravemente dañados no deben utilizarse para una prueba. Deben almacenarse adecuadamente hasta que el fabricante decida qué hacer con ellos. Si se decide que ya no son adecuados para las mediciones, deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional.
- (42) Los resultados obtenidos con este kit de pruebas no deben tomarse como la única razón de cualquier consecuencia terapéutica, sino que deben correlacionarse con otras pruebas diagnósticas y observaciones clínicas.

2.2 Limitaciones

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificación de esta prueba podría influir en los resultados.

⚠ Los anticuerpos antimetanefrina utilizados en este kit de prueba sólo reconocen las formas L biológicamente relevantes de la metanefrina. La metanefrina sintética comercializada es siempre una mezcla de las formas D y L. La proporción entre ambas formas varía mucho de un lote a otro. La proporción entre ambas formas difiere mucho de un lote a otro. Esto tiene importantes implicaciones si la Metanefrina sintética se utiliza para enriquecer muestras nativas. Dado que con este kit sólo se detectará aproximadamente el 50% de la metanefrina sintética (la porción L), las muestras enriquecidas se subestimarán. Por lo tanto, deben utilizarse muestras nativas que contengan únicamente la forma L.

2.2.1 Sustancias interferentes y manipulación adecuada de las muestras

Orina de 24 horas

¡Tenga en cuenta la toma de muestras! Si el porcentaje de la concentración final de ácido es demasiado alto, se obtendrán resultados incorrectos de las muestras de orina.

2.2.2 Interferencias medicamentosas y alimentarias

No se conocen sustancias (drogas) cuya ingestión interfiera con la medición de nivel de metanefrina en la muestra.

2.2.3 Efecto gancho de alta dosis

No se observó ningún efecto gancho en esta prueba.

3. Almacenamiento y estabilidad

Conservar el kit y los reactivos a 2 - 8 °C hasta la fecha de caducidad. No utilizar el kit y los componentes después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del kit. Una vez abiertos, los reactivos son estables durante 2 meses almacenados a 2 - 8 °C. Una vez abierta la bolsa resellable de la placa ELISA, debe tenerse la precaución de volver a cerrarla herméticamente incluyendo el desecante.

4. Materiales**4.1 Contenido del kit**

BA E-0030	WASH-CONC 50x	Tampón de lavado concentrado - concentrado 50x
Contenido:	Tampón con detergente no iónico y pH fisiológico	
Volumen:	1 x 20 ml/vial, tapón morado	
BA E-0045	CONJUGATE	Conjugado enzimático - listo para usar
Contenido:	Inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas con peroxidasa	
Volumen:	1 x 12 ml/vial, tapón rojo	
Descripción:	La especie es la cabra	
BA E-0055	SUBSTRATE	Sustrato - listo para usar
Contenido:	Sustrato cromogénico que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, tampón de sustrato y peróxido de hidrógeno.	
Volumen:	1 x 12 ml/vial, tapón negro	
BA E-0080	STOP-SOLN	Solución de paro - lista para usar
Contenido:	Ácido sulfúrico 0,25 M	
Volumen:	1 x 12 ml/vial, tapón gris	
BA E-0131	UJ ADR MN	Microplaca con tiras de Metanefrina - listas para usar
Contenido:	1 placa de micropocillos de 96 pocillos (12x8) precubierta de antígeno en una bolsa azul resellable con desecante	
BA E-8410	MN-AS	Antisuero de Metanefrina - listo para usar
Contenido:	Anticuerpo de conejo antimetanefrina en tampón con proteínas y conservante sin mercurio, de color azul	
Volumen:	1 x 12 ml/vial, tapón azul	
Descripción:	La especie del anticuerpo es conejo, la especie de la proteína en el tampón es bovina	
BA R-0012	ACYL-CONC	Concentrado de Acilación - concentrado
Contenido:	Reactivo de acilación concentrado	
Volumen:	1 x 0,5 ml/vial, tapón blanco	
Pictogramas de peligro:	 GHS07	
Palabra clave:	Advertencia	
Indicaciones de peligro:	H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.	
Consejos de prudencia:	P261 Evitar respirar la niebla/los vapores/el aerosol. P280 Llevar guantes de protección. P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua abundante. P333+P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. P362+P364 Quitarse la ropa contaminada y lavarla antes de volver a utilizarla. P501 Eliminar el contenido/el recipiente en un punto de recogida de residuos autorizado.	
BA R-0075	ACYL-DILUENT	Diluyente de Acilación - listo para usar
Contenido:	Dimetilsulfóxido	
Volumen:	1 x 3,5 ml/vial, tapón blanco	
BA R-8611	ACYL-BUFF	Tampón de Acilación - listo para usar
Contenido:	Tampón TRIS	
Volumen:	1 x 30 ml/vial, tapón blanco	

BA R-8619	HCL	Ácido Clorhídrico - listo para usar
Contenido:	Ácido clorhídrico 0,25 M, color amarillo	
Volumen:	1 x 30 ml/vial, tapón verde	

4.2 Calibración y controles

Normas y controles: listos para usar

Nº de cat.	Componente	Color/Tapa	Concentración [ng/ml] (= µg/l) MN	Concentración [nmol/l] MN	Volumen/V ial
BA R-8601	STANDARD A	blanco	0	0	4 ml
BA R-8602	STANDARD B	amarillo	20	101	4 ml
BA R-8603	STANDARD C	naranja	60	304	4 ml
BA R-8604	STANDARD D	azul oscuro	200	1,014	4 ml
BA R-8605	STANDARD E	gris	600	3,042	4 ml
BA R-8606	STANDARD F	negro	2,000	10,140	4 ml
BA R-8651	CONTROL 1	verde	Consulte el informe de control de calidad para conocer el valor esperado y el intervalo aceptable.		4 ml
BA R-8652	CONTROL 2	rojo			4 ml

Conversión: metanefrina [ng/ml] x 5,07 = metanefrina [nmol/l].

Contenido: Tampón ácido con conservantes sin mercurio, enriquecido con una cantidad definida de metanefrina.

4.3 Material adicional necesario pero no incluido en el kit

- Agua (desionizada, destilada o ultrapura)
- Material absorbente (toalla de papel)
- Tubos de reacción, al menos 3 ml, Polipropileno/Poliestirol

4.4 Equipamiento adicional necesario pero no incluido en el kit

- Pipetas de precisión calibradas para dispensar volúmenes entre 10 - 600 µl; 1,2 - 3 ml
- Dispositivo de lavado de placas de microtitulación (manual, semiautomático o automatizado)
- Lector ELISA capaz de leer la absorbancia a 450 nm y, si es posible, a 620 - 650 nm.
- Mezclador vórtex
- Baño de agua a temperatura controlada (90 °C) o dispositivo de calentamiento similar

 *El ensayo puede realizarse con o sin agitación. Si se utiliza un agitador de placas microtiter, debe tener las siguientes características: amplitud de agitación 3 mm; aprox. 600 rpm.*

5. Recogida, manipulación y almacenamiento de muestras

Se utilizará orina de 24 horas, recogida en un frasco que contenga 10 - 15 ml de HCl 6 M.

Determinar el volumen total de orina excretada durante un período de 24 h para el cálculo de los resultados.

Conservación: hasta 5 días a 2 - 8 °C, durante períodos más largos (hasta 6 meses) a -20 °C.

Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas. Evitar la exposición directa a la luz solar.

6. Procedimiento de ensayo

Deje que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente y mézclelos bien por inversión suave antes de utilizarlos. Numere los tubos de reacción y las placas de micropocillos (las tiras de microtitulación que se retiren del bastidor para su uso deben marcarse en consecuencia para evitar cualquier confusión). Se recomienda realizar determinaciones por duplicado d.

La unión de los antisueros y del conjugado enzimático y la actividad de la enzima dependen de la temperatura. Cuanto mayor sea la temperatura, mayores serán los valores de absorción. La variación de los tiempos de incubación tendrá una influencia similar en la absorbancia. La temperatura óptima durante el inmunoensayo enzimático se sitúa entre 20 - 25 °C.

6.1 Preparación de reactivos y notas adicionales

Tampón de lavado

Diluir el tampón de lavado concentrado **WASH-CONC** **50X** de 20 ml con agua hasta un volumen final de 1000 ml.

Conservación: 2 meses a 2 - 8 °C

Solución de acilación

⚠ Antes de preparar la Solución de Acilación asegúrese de que el **ACYL-DILUENT** (BA R-0075) ha alcanzado la temperatura ambiente (≥ 20 °C) y forma una solución homogénea y sin cristales.

Diluir el **ACYL-CONC** (BA R-0012) 1 + 60 con **ACYL-DILUENT** (BA R-0075) en un vial de vidrio o polipropileno.

ACYL-CONC (BA R-0012)	10 µl	15 µl	25 µl	50 µl
ACYL-DILUENT (BA R-0075)	600 µl	900 µl	1,5 ml	3 ml

⚠ La solución de acilación debe prepararse fresca antes del ensayo (con no más de 60 minutos de antelación). Deséchela después de usarla.

Tiras de microtitulación de metanefrina

En raras ocasiones pueden verse residuos del reactivo bloqueante y estabilizante en los pocillos en forma de pequeños puntos o líneas blancas. Estos residuos no influyen en la calidad del producto.

6.2 Preparación de las muestras

Hidrólisis

1. Pipetear **25 µl** de **estándares, controles y muestras de orina** en los respectivos tubos de reacción.
2. Añadir **250 µl** de **HCL** a todos los tubos.
3. Mezclar bien (vortex) e hidrolizar durante **30 min a 90° C**.
4. Enfriar los tubos a temperatura ambiente.

Acilación

1. Pipetear **250 µl** de **ACYL-BUFF** en todos los tubos.
 2. Añadir **25 µl** de **solución de acilación** (véase 6.1) a todos los tubos.
 3. Mezclar bien (vórtex) y acilar durante **15 min a RT** (20 - 25 °C).
 4. Añadir **2,5 ml de agua** (desionizada, destilada o ultrapura) a todos los tubos.
- ⚠ Tomar **25 µl** de los **estándares acilados, controles y muestras de orina** para el **ELISA de Metanefrina**.

6.3 Metanefrina ELISA

El uso de un agitador no es obligatorio. El protocolo alternativo sin agitador aparece resaltado en cursiva y sombreado en gris.

1. Pipetear **25 µl** de los **estándares acilados, controles y muestras** en los pocillos apropiados de las **tiras de microtitulación de metanefrina** **U** **ADR** **MN**.
2. Pipetear **100 µl** de **MN-AS** en todos los pocillos.
3. Incubar **30 min a RT** (20 - 25 °C) en un **agitador** (aprox. 600 rpm).
*Sin utilizar un agitador: agitar las tiras de microtitulación de metanefrina **U** **ADR** **MN** brevemente a mano e incubar durante **1 h a RT** (20 - 25 °C).*
4. Desechar o aspirar el contenido de los pocillos. Lavar la placa **3 veces** añadiendo **300 µl de tampón de lavado**, **desechar** el contenido y **secar cada vez** golpeando la placa invertida sobre material absorbente.
5. Pipetear **100 µl** del **CONJUGATE** en todos los pocillos.
6. Incubar durante **15 min a RT** (20 - 25 °C) en un **agitador** (aprox. 600 rpm).
*Sin utilizar agitador: incubar durante **15 min a RT** (20 - 25 °C).*

7.	Desechar o aspirar el contenido de los pocillos. Lavar la placa 3 veces añadiendo 300 µl de tampón de lavado , desechar el contenido y secar cada vez golpeando la placa invertida sobre material absorbente.
8.	Pipetear 100 µl del SUBSTRATE en todos los pocillos.
9.	Incubar durante 15 ± 2 min a RT (20 - 25 °C) en un agitador (aprox. 600 rpm). Sin uso de agitador: incubar durante 15 min ± 2 a RT (20 - 25 °C).
	⚠ Evite la exposición directa al sol.
10.	Añadir 100 µl de STOP-SOLN a todos los pocillos y agitar brevemente la placa de microtitulación.
11.	Leer la absorbancia de la solución en los pocillos en 10 minutos, utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm (si se dispone de él, se recomienda una longitud de onda de referencia entre 620 nm y 650 nm).

7. Cálculo de los resultados

Rango de medición	Metanefrina
	10,5 - 2.000 ng/ml

La curva estándar, que puede utilizarse para determinar la concentración de las muestras desconocidas, se obtiene trazando las lecturas de absorbancia (calcular la absorbancia media) de los estándares (lineal, eje y) frente a las concentraciones estándar correspondientes (logarítmica, eje x) utilizando una concentración de 0,001 ng/ml para el estándar A (esta alineación es obligatoria debido a la presentación logarítmica de los datos). Utilizar la regresión no lineal para el ajuste de curvas (por ejemplo, 4 parámetros, marquardt).

⚠ *Este ensayo es un ensayo competitivo. Esto significa que los valores de DO disminuyen con el aumento de la concentración del analito. Los valores DO encontrados por debajo de la curva estándar corresponden a altas concentraciones del analito en la muestra y deben ser reportados como positivos.*

Las concentraciones de las muestras y los controles pueden leerse directamente a partir de la curva estándar.

La cantidad de analito excretada por día [µg/día] se calcula según:

concentración de la muestra [en µg/l] x volumen de orina excretado por día [en l/día].

Ejemplo

La concentración de la muestra leída en la curva es de 125 µg/l. La cantidad de orina recogida durante 24 horas es de 1,3 l. Entonces la cantidad de analito excretada durante un día sería:

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

Las muestras que presenten concentraciones superiores a la norma más elevada (norma F) deberán diluirse con la norma A y volver a analizarse.

Conversión:

Metanefrina [ng/ml] x 5,07 = Metanefrina [nmol/l].

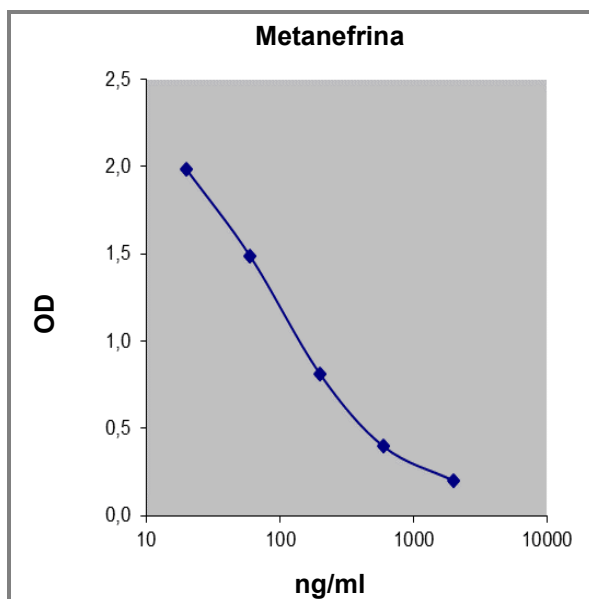
7.1 Valor de referencia previsto

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus propios valores de referencia.

	Metanefrina
Orina de 24 horas	< 350 µg/día

7.2 Curva estándar típica

⚠ Ejemplo: ¡No utilizar para cálculos!



8. Muestras de control

Se recomienda utilizar muestras de control de acuerdo con la normativa nacional. Utilice controles tanto normales como patológicos. Las muestras de control obtenidas comercialmente deben tratarse como muestras desconocidas. Las muestras de control deben estar dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza de los controles del kit se indican en el QC-Report.

9. Características del ensayo

9.1 Datos de rendimiento

Sensibilidad analítica	
	Metanefrina
Límite de blanco (LOB)	6,0 ng/ml
Límite de detección (LOD)	8,6 ng/ml
Límite de cuantificación (LOQ)	10,5 ng/ml

Especificidad analítica (reactividad cruzada)	
Sustancia	Reactividad cruzada [%]
	Metanefrina
Metanefrina derivatizada	100
Normetanefrina derivatizada	0.15
3-metoxitiramina derivatizada	< 0.01
Adrenalina	3.3
Noradrenalina	< 0.01
Dopamina	< 0.01
Ácido vanílico mandélico, L-Dopa, Ácido homovanílico, L-Tirosina, Tiramina	< 0.01

Precisión							
Intraensayo				Entre ensayos			
	Muestra	Intervalo [ng/ml]	CV [%]		Muestra	Intervalo [ng/ml]	CV [%]
Metanefrina	1	34.4 ± 3.1	9	Metanefrina	1	32.8 ± 5.4	16
	2	59.8 ± 5.1	9		2	57.2 ± 9.0	16
	3	141 ± 13.8	10		3	144 ± 25.0	17
	4	575 ± 71.4	12		4	394 ± 64.1	16

Recuperación			
	Intervalo [ng/ml]	Media [%]	Intervalo [%]
Metanefrina	20.2 - 1,484	97	85 - 113

Linealidad			
	Dilución en serie hasta	Media [%]	Intervalo [%]
Metanefrina	1:64	102	94 - 115

Comparación de métodos: ELISA frente a HPLC*.		
Metanefrina	HPLC = 0,9 ELISA - 0,8	r = 0,99; n = 40
* Las concentraciones se evaluaron utilizando tanto el método ELISA como el HPLC (muestras externas de control de calidad de UK NEQAS). La correlación entre ELISA y HPLC es excelente. Téngase en cuenta que los valores de control del Reino Unido son la media de unos 40 usuarios de HPLC diferentes y contienen siempre una muestra patológica por envío.		

10. Referencias/Literatura

- (4) Parrott et al. niveles urinarios de corticosterona y normetanefrina después de rueda voluntaria y forzada cinta rodante corriendo en el ratón db/db. Journal of Diabetes Mellitus, 1(4):71-78 (2011)
- (5) Petramala et al. Multiple Catecholamine-Secreting Paragangliomas: Diagnosis after Hemorrhagic Stroke in a Young Woman. Endocrine Practice, 14(3):340-346 (2008)
- (6) Sato et al. Central control of bone remodeling by neuromedin U. Nature Medicine, 13:1234-1240 (2007)

Para obtener documentación actualizada o cualquier otra información, póngase en contacto con su proveedor local.

11. Cambios

Versión	Fecha de publicación	Capítulo	Cambia
17.0	2023-10-24	4.1 4.1 4.3	- BA D-0023 Tubos de reacción retirados - Etiquetado de peligros actualizado según SDS - Tubos de reacción enumerados como material adicional

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta

Produkty powiązane:

- Nephrones Urine ELISA
- Normetanephrine Urine ELISA

1. Wprowadzenie**1.1. Przeznaczenie i zasada działania testu**

Immunoenzymatyczny test do ilościowego oznaczenia Metanefryny w moczu. Podczas przygotowania próbki Metanefryna (Metadrenalina) jest ilościowo acylowana. Ten kompetycyjny test ELISA wykorzystuje format płytki mikrotitracyjnej. Antygen jest związany z fazą stałą płytki mikrotitracyjnej. Acylowane standardy, kontrole i próbki oraz związany z fazą stałą analit współzawodniczą o stałą liczbę miejsc wiązania przeciwciał. Po osiągnięciu równowagi przez system, wolny antygen i wolne kompleksy antygen-przeciwciała są usuwane przez płukanie. Przeciwciała związane do fazy stałej jest wykrywane za pomocą anty-króliczych IgG sprzężonych z peroksydazą przy użyciu TMB jako substratu. Reakcja jest mierzona przy 450 nm. Ocena stężenia nieznanej próbki dokonywana jest poprzez porównanie jej absorbancji z krzywą referencyjną przygotowaną za pomocą standardów o znanym stężeniu. Zaleca się ręczne wykonanie tego testu ELISA. Za korzystanie z automatycznego sprzętu laboratoryjnego odpowiada użytkownik. Niniejszy test in-vitro jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego.

1.2. Aplikacja kliniczna

Metanefryna i Normetanefryna to metabolity katecholamin, odpowiednio epinefryny i norepinefryny. Są one metabolizowane do kwasu wanilinomigdałowego lub wydalone z moczem. Pacjenci z pheochromocytomą lub innymi nowotworami wywodzącymi się z komórek neuroendokrynnych, wykazują w moczu podwyższony poziom całkowitych metoksykatecholamin. Ponieważ wydzielanie katecholaminy z komórek neuroendokrynnych może wykazywać wysokie wahania, dla uśrednienia stosuje się próbki moczu zebranego w ciągu 24 godzin. Konsekwencje terapeutyczne nie powinny opierać się jedynie na wynikach laboratoryjnych, nawet jeśli wyniki te ocenia się zgodnie z kryteriami jakości metody. Wszelkie wyniki badań laboratoryjnych są tylko częścią całego obrazu klinicznego pacjenta. Jedynie w przypadkach, w których wyniki laboratoryjne w dopuszczalnym stopniu są zgodne z ogólnym obrazem klinicznym pacjenta, mogą zostać użyte do określenia działań terapeutycznych. Sam wynik testu nigdy nie powinien być jedynym wyznacznikiem determinującym jakiegokolwiek działania terapeutyczne.

2. Ograniczenia, środki ostrożności i uwagi ogólne**2.1. Środki ostrożności i uwagi ogólne**

- (1) Zestaw przeznaczony jest wyłącznie do użytku profesjonalnego. W celu skutecznego zastosowania testu, użytkownicy powinni dokładnie zaznajomić się z poniższym protokołem. Jedynie instrukcja dostarczona wraz z zestawem jest poprawna i musi być zastosowana do przeprowadzenia testu. Niezawodne działanie zostanie osiągnięte tylko poprzez ścisłe i staranne stosowanie się do dostarczonych instrukcji.
- (2) Test ten został zwalidowany dla określonego rodzaju próbki, jak wskazano w punkcie „Przeznaczenie” (patrz rozdział 1). Jakiegokolwiek użycie zestawu niezgodnie ze wskazaniami, dokonywane jest na własne ryzyko użytkownika, a producent nie może zostać pociągnięty do odpowiedzialności.
- (3) Zasady Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP) muszą być przestrzegane.
- (4) W celu ograniczenia narażenia na działanie potencjalnie szkodliwych substancji, podczas wykonywania testu należy nosić fartuchy laboratoryjne, jednorazowe rękawice ochronne i okulary ochronne w razie potrzeby.
- (5) Jeżeli w związku z tym produktem wystąpią poważne zdarzenia, należy je zgłosić producentowi i właściwym władzom krajowym.
- (6) Wszystkie odczynniki zestawu i próbki należy doprowadzić do temperatury pokojowej i delikatnie, ale dokładnie wymieszać przed użyciem. Do rozcieńczania lub rekonstrukcji należy używać wody dejonizowanej, destylowanej lub ultraczystej. Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania odczynników i próbek.

- (7) Mikropłytką zawiera odłamywane paski. Niewykorzystane dołki należy przechowywać w temperaturze 2 – 8°C w szczelnie zamkniętym woreczku foliowym ze środkiem osuszającym i używać w dostarczonej ramce. Paski do mikromiareczkowania wyjmowane z ramki w celu użycia należy odpowiednio oznaczyć, aby uniknąć pomyłek.
- (8) Wysoce rekomendowane jest podwójne oznaczanie próbki, w celu identyfikacji ewentualnych błędów pipetowania.
- (9) Po rozpoczęciu procedury wykonania testu, wszystkie czynności należy przeprowadzić bez przerw. Upewnij się, że wymagane odczynniki, materiały i urządzenia są przygotowane i będą gotowe w odpowiednim czasie.
- (10) Czas inkubacji wpływa na wyniki testu. Wszystkie dołki reakcyjne powinny być wypełniane w tej samej kolejności i jednakowych odstępach czasu.
- (11) W celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego odczynników, używaj nowych, jednorazowych końcówek pipet do dozowania każdego odczynnika, próbki, standardu i kontroli.
- (12) Krzywa standardowa musi zostać ustalona indywidualnie dla każdej serii oznaczeń.
- (13) Próby kontrole powinny być zawarte w każdej serii, a także powinny mieścić się w zakresie przyjętego przedziału ufności. Przedziały ufności są wymienione w raporcie QC (kontrola jakości).
- (14) Nie należy mieszać składników zestawów o różnych numerach serii w jednym teście i nie należy używać odczynników po upływie terminu ważności, umieszczonego na etykietach zestawu.
- (15) Należy unikać kontaktu z Roztworem Blokującym (Stop Solution) zawierającym 0,25 M H₂SO₄. Może on powodować podrażnienia skóry i oparzenia. W przypadku kontaktu z oczami lub skórą natychmiast przepłukać wodą.
- (16) Substrat TMB wykazuje drażniące działanie na skórę i błonę śluzową. W przypadku ewentualnego kontaktu oczy należy przemyć obfitą ilością wody zaś skórę dużą ilością wody i mydłem. Zanieczyszczone przedmioty umyć przed kolejnym użyciem.
- (17) W celu uzyskania informacji na temat substancji niebezpiecznych zawartych w zestawie należy zapoznać się z Kartą Charakterystyki Substancji Niebezpiecznej (MSDS). Karta Charakterystyki dla tego produktu jest dostępna bezpośrednio na stronie producenta lub na żądanie.
- (18) Odczynniki zestawu należy traktować jako odpady niebezpieczne i utylizować zgodnie z przepisami krajowymi.
- (19) Oczekiwane wartości referencyjne podane w niniejszej instrukcji są jedynie orientacyjne. Zaleca się, aby każde laboratorium ustanowiło swoje własne przedziały referencyjne.
- (20) W przypadku jakiegokolwiek poważnego uszkodzenia zestawu testowego lub komponentów należy poinformować producenta pisemnie najpóźniej tydzień po otrzymaniu zestawu. Do przeprowadzenia badania nie wolno używać poważnie uszkodzonych pojedynczych elementów. Muszą być odpowiednio przechowywane, dopóki producent nie zdecyduje, co z nimi zrobić. Jeśli zostanie podjęta decyzja, że nie nadają się już do pomiarów, należy je zutylizować zgodnie z przepisami krajowymi.
- (21) Wyniki uzyskane przy użyciu tego zestawu testowego nie powinny być traktowane jako jedyny powód, dla zastosowania działań terapeutycznych (np. lek przed planowanym zabiegiem), ale muszą być skorelowane z innymi badaniami diagnostycznymi i obserwacją kliniczną.

2.2. Ograniczenia

Wszelkie nieodpowiednie postępowanie z próbkami lub modyfikacje tego testu mogą wpłynąć na jego wyniki.



Przeciwciała anti-Metanefryna użyte w zestawie testowym rozpoznaje tylko biologicznie istotną L-formę Metanefryny. Komercyjnie dostępna syntetyczna Metanefryna jest zawsze mieszaniną form D i L. Stosunek zawartości obu form różni się znacznie między poszczególnymi partiami. Ma to istotne znaczenie w przypadku gdy syntetyczna Metanefryna jest używana do wzbogacania próbek natywnych. Ponieważ tylko około 50%

Metanefryny syntetycznej jest wykrywana przy użyciu tego zestawu, próbki wzbogacone będą zaniżone. W związku z tym należy stosować wyłącznie natywne próbki zawierające tylko L-formę.

2.2.1. Substancje powodujące interferencje i prawidłowe postępowanie z próbkami

Mocz 24-godzinny

Proszę zwrócić uwagę na przygotowanie próbki! Jeśli procent końcowego stężenia kwasu jest zbyt wysoki, doprowadzi to do nieprawidłowych wyników dla próbek moczu.

2.2.2. Leki i żywność powodujące interferencje

Nie są znane substancje (leki), których spożycie zakłóca pomiar poziomu Metanefryny w próbce.

2.2.3. Efekt wysokiej dawki

W teście nie zaobserwowano efektu wysokiej dawki.

3. Przechowywanie i stabilność

Nieotwarte odczynniki przechowywać w temperaturze 2 - 8°C do daty ważności. Nie należy używać składników zestawu po upływie daty ważności podanej na etykiecie. Po otwarciu odczynniki przechowywane w temp. 2 - 8°C pozostaną stabilne przez okres 2 miesięcy. Po otwarciu foliowej torby należy ze szczególną ostrożnością zadbać o jej ponowne szczelne zamknięcie wraz ze środkiem osuszającym.

4. Materiały

4.1. Zawartość zestawu

BA E-0030 **WASH-CONC 50x** Skoncentrowany Bufor Płuczający (Wash Buffer Concentrate)

- 50x skoncentrowany

Zawartość: Bufor z niejonowym detergentem i fizjologicznym pH

Pojemność: 1 x 20 ml / fiolkę, jasno fioletowa zakrętka

BA E-0045 **CONJUGATE** Koniugat Enzymu (Enzyme Conjugate)- gotowy do użycia

Zawartość: Kozie anti-królicze immunoglobuliny sprzężone z peroksydazą

Pojemność: 1 x 12 ml / fiolkę, czerwona zakrętka

BA E-0055 **SUBSTRATE** Substrat (Substrate) - gotowy do użycia

Zawartość: Chromogeny substrat zawierający 3,3',5,5'-tetrametylobenzidynę, bufor substratu i nadtlenek wodoru

Pojemność: 1 x 12 ml / fiolkę, czarna zakrętka

BA E-0080 **STOP-SOLN** Roztwór Blokujący (Stop Solution) - gotowy do użycia

Zawartość: 0,25 M kwas siarkowy

Pojemność: 1 x 12 ml / fiolkę, jasnoszara zakrętka

BA E-0131 **NAD NMN** Metanefryna - Paski Mikrotitracyjne (Metanephrine Microtiter Strips) - gotowe do użycia

Zawartość: 1 x 96 dołków (12x8) Płytki z dołkami reakcyjnymi opłaszczona antygenem, dostarczona w niebieskim zamykanym worku ze środkiem osuszającym

BA E-8410 **NMN-AS** Metanefryna Antysurowica (Metanephrine Antiserum)

- gotowa do użycia

Zawartość: Królicze przeciwciała anti-metanefryna w buforze z białkami i środkiem konserwującym niezawierającym rtęci, niebieski kolor

Pojemność: 1 x 12 ml / fiolkę, niebieska zakrętka

Opis: Przeciwciała pochodzenia króliczego, białka w buforze pochodzenia bydłęcego

BA R-0012 **ACYL-CONC** Koncentrat do acylacji (Acylation Concentrate) - skoncentrowany

Zawartość: Skoncentrowany odczynnik acylujący
 Pojemność: 1 x 0,5 ml / fiolkę, biała zakrętka
 Identyfikacja zagrożeń:



GHS07

Hasło ostrzegawcze: Ostrzeżenie

Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia: H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry.

Zwroty wskazujące środki ostrożności:

P261 Unikać wdychania mgły/par/rozpylonej cieczy.

P280 Stosować rękawice ochronne.

P302+P352 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody.

P333+P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P362+P364 Zdjąć zanieczyszczoną odzież i wyprać ją przed ponownym użyciem.

P501 Zawartość/pojemnik usuwać do autoryzowanego punktu zbiórki odpadów.

BA R-0075 **ACYL-DILUENT** **Rozcieńczalnik do acylacji (Acylation Diluent)** - gotowy do użycia

Zawartość: Dimetylosulfotlenek

Pojemność: 1 x 3,5 ml / fiolkę, biała zakrętka

BA R-8611 **ACYL-BUFF** **Bufor do acylacji (Acylation Buffer)** - gotowy do użycia

Zawartość: bufor TRIS

Pojemność: 1 x 30 ml / fiolkę, biała zakrętka

BA R-8619 **HCL** **Kwas Chlorowodorowy (Hydrochloric Acid)** - gotowy do użycia

Zawartość: 0.25 M kwas solny, żółta barwa

Pojemność: 1 x 30 ml / fiolka, zielona zakrętka

4.2. Standardy i Kontrole (Standards and Controls) - gotowe do użycia

Nr. kat.	Komponent	Kolor/ nakrętka	Stężenie ng/ml (ug /L)	Stężenie nmol /l	Zawartość/ fiolka
BA R-8601	STANDARD A	biały	0	0	4 ml
BA R-8602	STANDARD B	żółty	20	101	4 ml
BA R-8603	STANDARD C	pomarańczowy	60	304	4 ml
BA R-8604	STANDARD D	niebieski	200	1 014	4 ml
BA R-8605	STANDARD E	szary	600	3 042	4 ml
BA R-8606	STANDARD F	czarny	2000	10 140	4 ml
BA R-8651	CONTROL 1	zielony	Oczekiwane wartości oraz dopuszczalny zakres zawarto w raporcie QC!		4 ml
BA R-8652	CONTROL 2	czerwony			4 ml

Przekształcenie: Metanefryna (ng /ml) x 5,07 = Metanefryna (nmol/l)

Treść: Bufor kwasowy z konserwantami niezawierającymi rtęci, wzbogacony zdefiniowaną ilością Metanefryny

4.3. Dodatkowe materiały wymagane, ale niedostarczone z zestawem

- Ręcznik papierowy
- Woda (dejonizowana, destylowana lub ultra-czysta)
- Probówki reakcyjne co najmniej 3 ml, Polipropylen/Polistyrol

4.4. Dodatkowe wyposażenie wymagane, ale niedostarczone z zestawem

- Kalibrowane pipety do dozowania ilości od 10-600µl; 1,2 – 3ml
- Płuczka płytek mikrotitracyjnych (ręczna, półautomatyczna lub automatyczna)
- Czytnik ELISA z możliwością pomiaru absorpcji przy dł. fali 450 nm i 620 lub 650 nm

- Wortexs
- Łaźnia wodna z regulacją temperatury (90 °C) lub podobne urządzenie grzewcze

Test  może być przeprowadzony z wytrząsaniem lub bez wytrząsania. W przypadku wytrząsania należy użyć wytrząsarki o następujących parametrach: amplituda wytrząsania 3mm; około 600 rpm.

5. Pobieranie i przygotowanie próbek

Należy użyć próbki zgromadzonej w wyniku 24 godzinnej zbiórki (za pomocą zbiornika zawierającego 10-15 mL 6 M HCl).

Aby obliczyć wyniki należy określić całkowitą objętość moczu wydalonego w ciągu 24h.

Przechowywanie: do 5 dni w temperaturze 2-8°C, przez dłuższy okres (do 6 miesięcy) w -20°C. Należy unikać powtarzających się etapów zamrażania i rozmrażania. Unikać bezpośredniej ekspozycji na światło.

6. Procedura testu

Przed wykonaniem oznaczeń wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową, należy je również wymieszać przez delikatne odwracanie fiolek. Ponumerować probówki reakcyjne i płytki z mikrostudzienkami (paski do mikromiareczkowania wyjmowane z ramki w celu użycia należy odpowiednio oznaczyć, aby uniknąć pomyłki). Zaleca się wykonanie pomiarów w powtórzeniach.

Zarówno wiązanie przeciwciał i koniugatu enzymu, jak i aktywność użytego enzymu są zależne od temperatury. Im wyższa temperatura, tym wyższe będą wartości absorpcji. Różne czasy inkubacji będą miały podobny wpływ na absorbancję. Optymalna temperatura podczas testu immunoenzymatycznego wynosi 20–25 °C.

6.1. Przygotowanie odczynników i dalsze uwagi

Bufor Płuczący

Rozcieńczyć 20 ml skoncentrowanego Buforu Płuczącego z wodą do końcowej objętości równej 1000 ml.

Przechowywanie: 2 miesiące w 2–8°C

Roztwór Acylujący

Przed  przygotowaniem Roztworu Acylującego należy sprawdzić czy Rozcieńczalnik do acylacji (BA R-0075) osiągnął temperaturę pokojową ($\geq 20^{\circ}\text{C}$) i tworzy homogeny, pozbawiony kryształów roztwór.

Należy rozcieńczyć Koncentrat do acylacji (BA R-0012) 1 + 60 z Rozcieńczalnikiem do acylacji w szklanych lub polipropylenowych fiolkach.

Koncentrat do acylacji	10 μL	15 μL	25 μL	50 μL
Rozcieńczalnik do acylacji	600 μL	900 μL	1.5 mL	3 mL



Roztwór Acylujący musi być przygotowany na świeżo tuż przed wykonaniem testu (nie dłużej niż 60 minut przed). Niewykorzystany roztwór należy wylać!

Paski mikrotitracyjne do metanefryny

W rzadkich przypadkach pozostałości odczynnika blokującego i stabilizującego można zobaczyć w dołkach jako małe, białe linie lub kropki. Te pozostałości nie wpływają na jakość produktu.

6.2. Przygotowanie próbek

Hydroliza

1. Odpipetować 25µL standardów, kontroli, próbek moczu do odpowiednich Probówek Reakcyjnych .
2. Dodać 250 µL HCL Kwasu Chlorowodorowego do wszystkich probówek.
3. Dokładnie wymieszać (worteks) i hydrolizować przez 30 min. w temp. 90 °C .
4. Probówki ochłodzić do temperatury pokojowej.

Acylacja

1. Odpipetować 250 µL ACYL-BUFF Buforu do acylacji do wszystkich probówek.
2. Dodać 25 µL Roztworu Acylującego (patrz pkt 6.1) do wszystkich probówek.
3. Dokładnie wymieszać (worteks) i acylować przez 15 minut w temp. pokojowej (20-25°C) .
4. Dodać 2.5 mL wody (dejonizowanej, destylowanej lub ultra-czystej) do wszystkich probówek.
 Pobrać 25 µL acylowanych standardów, kontroli i próbek moczu do testu Metanefryna ELISA .

6.3. Metanefryna ELISA

Wykorzystanie wytrząsarki nie jest obowiązkowe. Alternatywny protokół bez wytrząsarki jest zaznaczony kursywą na szarym tle.

1. Odpipetować 25 µL acylowanych standardów, kontroli i próbek do odpowiednich dołków na Paskach Mikrotitracyjnych Metanefryny ADR MN .
2. Odpipetować 100 µL MN-AS Metanefryny Antysurowicy do wszystkich dołków.
3. Inkubować 30 min. w temp. pok. (20-25°C) na wytrząsarce (około 600 rpm). <i>Bez użycia wytrząsarki: krótko zamieszać (ręką) Paskami Mikrotitracyjnymi Metanefryny ADR MN i inkubować przez 1 godzinę w temp. pok. (20-25°C).</i>
4. Zlać lub zaaspirować zawartość dołków. Przepłukać płytkę 3 x dodając po 300 µL Buforu Płuczającego , wylać zawartość i osuszać każdorazowo ostukując odwróconą płytkę na papierowym ręczniku.
5. Odpipetować 100 µL CONJUGATE Koniugatu Enzymu do wszystkich dołków.
6. Inkubować przez 15 min. w temp. pok. (20-25°C) na wytrząsarce (około 600 rpm). <i>Bez użycia wytrząsarki: inkubować przez 15 min. w temp. pok. (20-25°C).</i>
7. Zlać lub zaaspirować zawartość dołków. Przepłukać płytkę 3 x dodając 300 µL Buforu Płuczającego , wylać zawartość i osuszać każdorazowo ostukując odwróconą płytkę na papierowym ręczniku.
8. Odpipetować 100 µL SUBSTRATE Substratu do wszystkich dołków.
9. Inkubować 15 ± 2 min w temp. pok. (20-25°C) na wytrząsarce (około 600 rpm). <i>Bez użycia wytrząsarki: inkubować przez 15 min ± 2 min w temp. pok. (20-25°C).</i> Unikać bezpośredniej ekspozycji na światło słoneczne!
10. Dodać 100 µL STOP-SOLN Roztworu Blokującego do wszystkich dołków i zamieszać płytką mikrotitracyjną by zapewnić odpowiednie wymieszanie roztworu.
11. W ciągu 10 minut odczytać absorbancję roztworu znajdującego się w dołkach, używając czytnika płytek mikrotitracyjnych przy długości fali 450 nm (w przypadku dostępności zaleca się falę referencyjną o długości pomiędzy 620 nm a 650 nm).

7. Obliczanie wyników

Zakres pomiaru	Metanefryna
	10.5 - 2 000 ng/ml

Krzywą wzorcową, którą można wykorzystać do określenia stężenia nieznanych próbek, uzyskuje się poprzez wykreślenie odczytów absorbancji (obliczenie średniej absorbancji) wzorców (liniowa, oś y) względem odpowiednich stężeń wzorców (logarytmiczna, x- osi) stosując stężenie 0,001 ng/ml dla Standardu A (to wyrównanie jest obowiązkowe ze względu na logarytmiczną prezentację danych). Użyj regresji nieliniowej do dopasowania krzywej (np. 4-parametrowa, marquardt).

Test ten jest testem konkurencyjnym. Oznacza to, że wartości OD zmniejszają się wraz ze wzrostem stężenia analitu. Wartości OD znajdujące się poniżej krzywej standardowej odpowiadają na wysokie stężenia analitu w próbce i muszą być zgłaszane jako pozytywne.

Stężenie próbek i kontroli może być odczytane bezpośrednio z krzywej standardowej.

Ilość analitu wydzielona w ciągu doby (µg/dzień) jest obliczana zgodnie z:

Stężenie próbki (w µg/L) x objętość moczu wydzielonego w ciągu doby (w L/dzień)

Przykład

Stężenie próbki odczytane z krzywej wynosi 125 µg/L. Ilość moczu zebrana w ciągu 24h wynosi 1.3 L. Ilość analitu wydzielona w ciągu doby będzie wynosiła:

$$125 \mu\text{g/L} \times 1.3 \text{ L/dzień} = 162.5 \mu\text{g/dzień}$$

Próbki o stężeniu wyższym niż najwyższy standard (standard F) należy odpowiednio rozcieńczyć ze standardem A i ponownie oznaczyć.

Przekształcenie

Metanefryna (ng/mL) x 5.07 = Metanefryna (nmol/L)

7.1. Oczekiwane wartości referencyjne

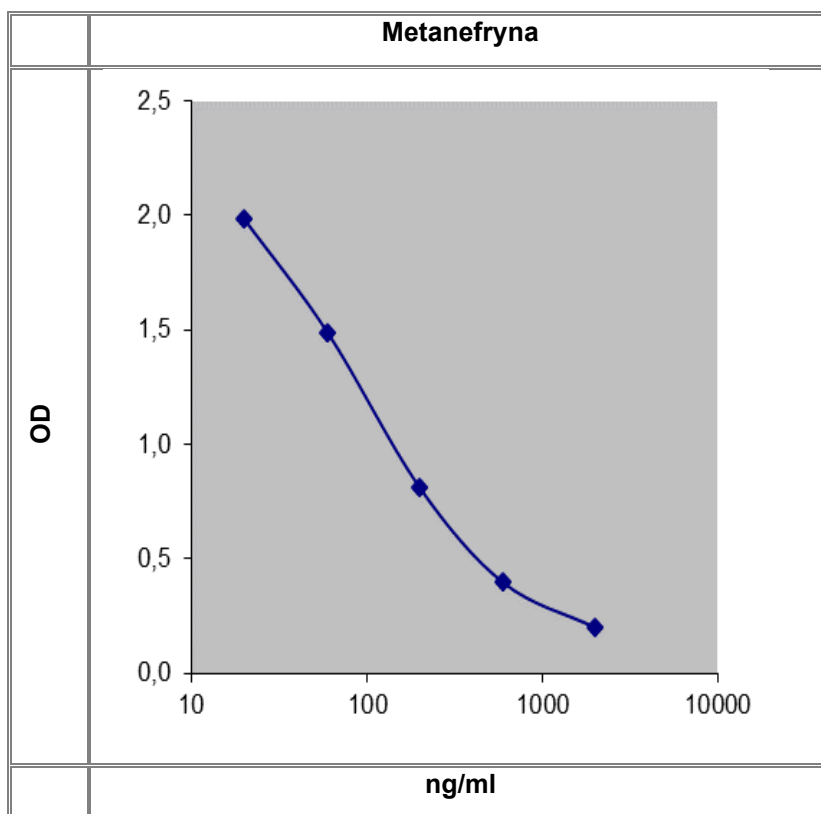
Zaleca się, aby każde laboratorium określiło swoje własne wartości referencyjne.

	Metanefryna
Mocz 24-godzinny	< 350 µg/dzień

7.2. Typowa krzywa kalibracyjna



Przykład. Nie używać do obliczeń!



8. Próbkki kontrolne

Zaleca się stosowanie próbek kontrolnych zgodnie z przepisami krajowymi. Stosować kontrole zarówno na poziomie prawidłowym, jak i patologicznym. Kontrole komercyjne należy traktować jak próbki nieznane. Próbkki kontrolne powinny mieścić się w ustalonych granicach ufności. Granice ufności kontroli zestawu podano w raporcie kontroli jakości.

9. Cechy zestawu**9.1. Wydajność**

Czułość analityczna	
	Metanefryna
Granica próby ślepej (LOB)	6.0 ng/ml
Granica wykrywalności (LOD)	8.6 ng/ml
Granica oznaczalności (LOQ)	10.5 ng/ml
Specyficzność analityczna (reaktywność krzyżowa)	
Substancja	Reaktywność krzyżowa (%)
	Metanefryna
Derywatyzowana Metanefryna	100
Derywatyzowana Normetanefryna	0.15
Derywatyzowana 3- metoksytyramina	< 0.01
Adrenalina	3.3
Noradrenalina	< 0.01
Dopamina	< 0.01
Kwas wanilinomigdałowy, L-Dopa, kwas homowanilinowy, L-Tyrosin, Tyramina	< 0.01

Precyzja							
W obrębie zestawu (Intra-Assay)				Pomiędzy zestawami (Inter-Assay)			
	Próbka	Zakres (ng/ml)	CV (%)		Próbka	Zakres (ng/ml)	CV (%)
Metanefryna	1	34.4 ± 3.1	9	Metanefryna	1	32.8 ± 5.4	16
	2	59.8 ± 5.1	9		2	57.2 ± 9.0	16
	3	141 ± 13.8	10		3	144 ± 25.0	17
	4	575 ± 71.4	12		4	394 ± 64.1	16

Pomiar znanego wzorca			
	Zakres (ng/ml)	Średnia [%]	Zakres [%]
Metanefryna	20.2 – 1,484	97	85 – 113

Liniowość			
	Rozcieńczenie do	Średnia [%]	Zakres [%]
Metanefryna	1:64	102	94 – 115

Porównanie metod: ELISA vs. HPLC*		
Metanefryna	HPLC = 0.9 ELISA – 0.8	r = 0.99; n = 40
* Stężenie było określane za pomocą metod ELISA i HPLC (kontrola zewnętrzna z UK NEQAS). Korelacja między ELISA oraz HPLC jest doskonała. Należy wziąć pod uwagę, że wartości kontrolne UK są średnią z wyników około 40 różnych użytkowników HPLC i zawsze zawierają jedną patologiczną próbkę.		

10. Literatura

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

11. Zmiany

Wersja	Data wydania	Rozdział	Zmiana
17.0	2023-10-24	4.1 4.1 4.3	- BA D-0023 Usunięte próbki reakcyjne - Zaktualizowano oznakowanie zagrożeń zgodnie z kartą charakterystyki - Probówki reakcyjne wymienione jako materiał dodatkowy

SYMBOLE

Symbol	English	Polski	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	Zgodny z dyrektywami Unii Europejskiej	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Zapoznać się z instrukcją użytkowania	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	Do diagnostyki in vitro	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Wyłącznie do celów badawczych	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Nr katalogowy	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Nr LOT	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Wystarczająca zawartość dla <n> testów	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Uwagi, ostrzeżenia i środki ostrożności	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Temperatura przechowywania	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Data ważności	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Producent	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Dystrybuowany przez	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Wersja	Version	Versión	Versione
	Single-use	Nie używać ponownie	À usage unique	Uso único	Uso una volta