



Gebrauchsanweisung

Nor- / Metanephrin – ELISA in Urin

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
Metanephrin und Normetanephrin
in Urin

RUO

REF MNUE00



2 x 96



2 – 8 °C



WESAMIN GmbH & Co.KG /
Gesellschaft für die Entwicklung und Produktion von diagnostischen Artikeln mbH
Graff 1 • 24568 Oersdorf • Tel 04191-722 68 65 • Fax 04191-722 68 67
E-Mail: kontakt@wesamin.de • Internet: www.wesamin.de

Verwendete Symbole

CONT Inhalt



Verwendbar bis

LOT Chargenbezeichnung



Temperaturbegrenzung



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

REF Bestellnummer



Gebrauchsanweisung beachten

R U O Forschungszwecke

Die Symbole der Komponenten des Kits sind im Kapitel 4 **Inhalt des Testkits** beschrieben.

1. Einleitung und Testprinzip

Normetanephrin und Metanephrin sind physiologische Abbauprodukte der Catecholamine, aus denen sie durch das Enzym Catechol-O-methyltransferase (COMT) gebildet werden.

Der Nor-/Metanephrin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem Metanephrin und Normetanephrin in humanem Urin. Durch Hydrolyse werden konjugiertes Metanephrin und Normetanephrin im Urin in das freie Metanephrin und Normetanephrin umgewandelt.

Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei werden Metanephrin und Normetanephrin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-Metanephrin und N-Acyl-Normetanephrin umgewandelt.

Der Nor-/Metanephrin-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. An die Festphase gebundenes und freies, in Lösung befindliches Antigen konkurrieren um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex in einem Waschschrift entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines Peroxidase-Konjugats nachgewiesen und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Die TMB/POD-Reaktion wird gestoppt und bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.

2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testkits sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testkits enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in *4. Inhalt des Testkits* und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden.
- Zerbrochenes Glas kann zu Verletzungen führen. Vorsicht bei Glasgefäßen.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6.1 geregelt.

Die Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

4. Inhalt des Testkits

4.1	Mikrotiterstreifen 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit Metanephrin oder Normetanephrin	STRIPS-MN STRIPS-NMN	2 x 12 Stück
4.2	Standards 1 - 6 4 ml, gebrauchsfertig	CAL 1 - 6	6 Fläschchen
4.3	Kontrolle 1 & 2 4 ml, gebrauchsfertig; Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat	CON 1 & 2	2 Fläschchen
4.4	Acylierungspuffer 3,5 ml, gebrauchsfertig, reizend	ACYL-BUFF	 1 Fläschchen
4.5	Acylierungsreagenz 1,75 ml, lyophilisiert, mit Solvent auflösen	ACYL-REAG	3 Fläschchen
4.6	Metanephrin-Antiserum 7 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acyl-Metanephrin	AS-MN	 1 Fläschchen
4.7	Normetanephrin-Antiserum 7 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acyl-Normetanephrin	AS-NMN	 1 Fläschchen
4.8	Enzymkonjugat 21 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ	 1 Fläschchen
4.9	Waschpuffer 20 ml, Konzentrat (50x)	WASH	2 Fläschchen
4.10	Substrat 21 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	SUB	1 Fläschchen
4.11	Stopplösung 21 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3 M Schwefelsäure	STOP	1 Fläschchen
4.12	Hydrolyse - Röhrchen für die Hydrolyse	HYDRO-TUBE	98 Stück
4.13	Salzsäure 12 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,1 M Salzsäure	HCL	1 Fläschchen
4.14	Solvent 7 ml, gebrauchsfertig, enthält DMSO	SOLVENT	1 Fläschchen
4.15	Haftklebefolie gebrauchsfertig	FOIL	4 Stück

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 10, 20, 25, 50, 100 und 500 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Wasserbad oder Heizblock
- Vortex-Mischer, Rollmischer
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr
- Zentrifuge

5. Probengewinnung und -lagerung

Es kann sowohl Spontanurin als auch Sammelurin verwendet werden. Zur Gewinnung des Sammelurins wird der gesamte Urin, der während einer Periode von 24 Stunden ausgeschieden wird, in einem Behälter, der 10 - 15 ml 6 M Salzsäure als Konservierungsmittel enthält, gesammelt. Direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden. Das Gesamtvolumen wird bestimmt und ein Aliquot für die Messung entnommen. Bei Verdacht auf eine Nierenfunktionsstörung sollte auch eine Kreatininbestimmung durchgeführt werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben sollte vermieden werden.

Urine vor Gebrauch mischen und zentrifugieren.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Acylierungs-Reagenz

ACYL-REAG

Vor Verwendung muss das Solvent **SOLVENT** auf Raumtemperatur ($\geq 20^\circ \text{C}$) gebracht werden und eine klare Lösung bilden!

Inhalt des Fläschchens mit 1,75 ml Solvent **SOLVENT** lösen und mindestens 5 Minuten auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann mind. 3 Stunden stabil. Durch die 2. und 3. Flasche im Kit ist der ELISA in zwei oder drei Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt von zwei Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Waschpuffer

Inhalt (20 ml) des Waschpufferkonzentrates (50x) **WASH** mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

Wird der Kit in mehreren Ansätzen verwendet, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Probenvorbereitung (Hydrolyse und Acylierung)

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

1. **10 µl der Standards** CAL 1 – 6, **Kontrollen** CON 1 & 2 **und Proben** in entsprechend wasserfest beschrifteten **Hydrolyseröhrchen** HYDRO-TUBE pipettieren.
2. **100 µl Salzsäure** HCL in alle Röhrchen pipettieren.

ACHTUNG: Sollen das freie Metanephrin und das freie Normetanephrin bestimmt werden, entfällt die Inkubation bei 90 °C (Schritt 3 + 4).

3. Röhrchen gut verschließen, mischen (vortexen) und 30 Minuten bei 90 -100 °C im Wasserbad oder auf einem Heizblock inkubieren.
4. Röhrchen auf Raumtemperatur abkühlen, kurz zentrifugieren, um anhaftende Tropfen zu vereinigen, Deckel werfen.
5. **25 µl Acylierungspuffer** ACYL-BUFF in alle Röhrchen pipettieren.
6. Bitte beachten: Solvent reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschrälen. Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.
Bitte Multipetten oder Ähnliches verwenden, das gelöste Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und pipettieren.

20 µl gelöstes Acylierungsreagenz ACYL-REAG in jedes einzelne Röhrchen pipettieren und sofort jedes Röhrchen einzeln, ca. 2 bis 4 Sekunden vortexen (mittlere Vortexgeschwindigkeit), dann erst mit dem nächsten Röhrchen fortfahren. Rotfärbung entsteht.

7. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
8. **500 µl destilliertes Wasser** in alle Röhrchen pipettieren und gut mischen (vortexen).

Jeweils 50 µl werden im Metanephrin-, 20 µl im Normetanephrin ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung

7.1

Metanephrin- ELISA

1. **50 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Metanephrin Mikrotiterstreifen (blau) **STRIPS-MN** pipettieren.
2. **50 µl Metanephrin-Antiserum** **AS-MN** in alle Vertiefungen pipettieren, Blaufärbung entsteht.
3. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abkleben und 1 Stunde bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer** (s. 6.1) füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papiertuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen. Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
5. **100 µl Enzymkonjugat** **CONJ** in alle Vertiefungen pipettieren.
6. 20 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. **100 µl Substrat** **SUB** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 20 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. **100 µl Stopplösung** **STOP** in alle Vertiefungen pipettieren, mindestens 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

**Normetanephrin-
ELISA**

1. **20 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Normetanephrin Mikrotiterstreifen (gelb) **STRIPS-NMN** pipettieren.
2. **50 µl Normetanephrin- Antiserum** **AS-NMN** in alle Vertiefungen pipettieren, Gelbfärbung entsteht.
3. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abkleben und 1 Stunde bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer** (s. 6.1) füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papiertuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen. Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
5. **100 µl Enzymkonjugat** **CONJ** in alle Vertiefungen pipettieren.
6. 20 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. **100 µl Substrat** **SUB** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 20 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. **100 µl Stopplösung** **STOP** in alle Vertiefungen pipettieren, mindestens 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

8. Auswertung und Beurteilung

Standard:		1	2	3	4	5	6
Metanephrin	ng / ml	0	20	60	200	600	2.000
	nmol / l	0	101	304	1.014	3.042	10.140
Normetanephrin	ng / ml	0	30	100	300	1.000	3.000
	nmol / l	0	164	546	1.638	5.460	16.380

Umrechnung:

Metanephrin: 1 ng / ml = 5,07 nmol / l

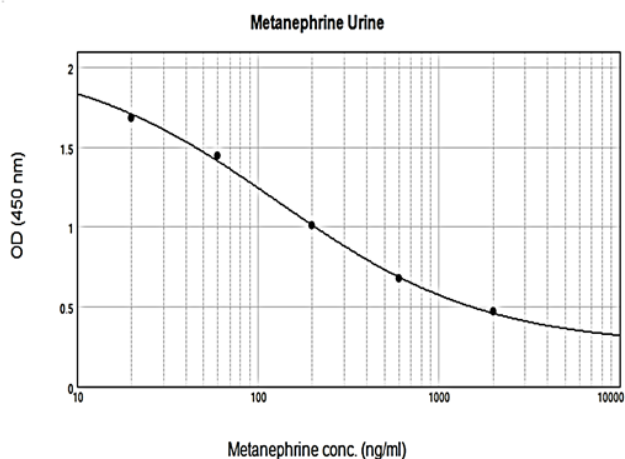
Normetanephrin: 1 ng / ml = 5,46 nmol / l

Die ODs (optische Dichten) der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

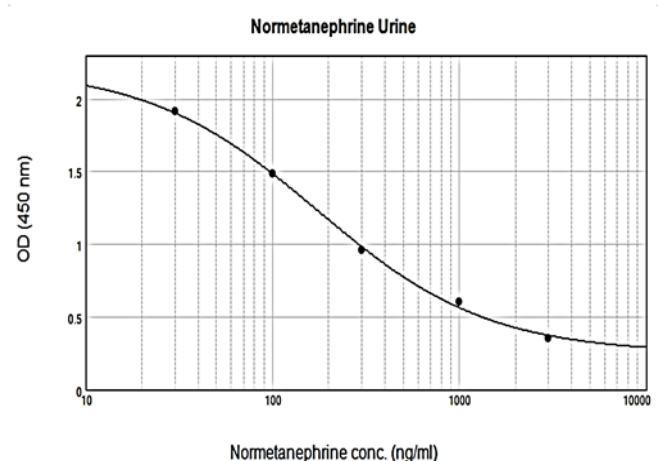
Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen (Alternativ: Cubic-Spline oder Logit-Log).

Die Konzentrationen der Proben können direkt aus der Standardkurve in ng / ml abgelesen werden.

Die Abbildungen zeigen typische Beispiele:



Metanephrin Urin ELISA



Normetanephrin Urin ELISA

Qualitätskontrolle: Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des Qualitätskontrollzertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.

9. Testcharakteristika

9.1 analytische Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze wurde bestimmt, indem die 2-fache Standardabweichung der optischen Dichte (OD) des Nullstandards gemessen und die entsprechende Konzentration an der Standardkurve abgelesen wurde.

	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Metanephrin	4 ng/ml	$OD_{Cal1} - 2 \times SD$
Normetanephrin	10 ng/ml	$OD_{Cal1} - 2 \times SD$

9.2 analytische Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Die im Test verwendeten Antikörper sind spezifisch für das entsprechende Antigen. Folgende Substanzen wurden hinsichtlich der Kreuzreaktivitäten getestet:

Substanz	Metanephrin (%)	Normetanephrin (%)
Metanephrin	100	0,775
Normetanephrin	0,430	100
3-Methoxytyramin	< 0,025	0,282
Adrenalin	0,875	< 0,022
Noradrenalin	< 0,025	1,360
Tyramin	0,001	< 0,001
Dopamin	< 0,025	< 0,022
Homovanilinsäure	< 0,001	< 0,001
Vanilinmandelsäure	< 0,001	< 0,001
L-Dopa	< 0,001	< 0,001
L-Tyrosin	< 0,001	< 0,001

9.3 Wiederfindung nach Spiken

	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Metanephrin	10 - 952	107	86 - 124
Normetanephrin	14 - 952	110	92 - 121

9.4 Linearität (Wiederfindung nach Verdünnung mit Standard 1)

	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Metanephrin	85 - 2134	1 : 21	90	77 - 106
Normetanephrin	52 - 1243	1 : 21	93	79 - 102

9.5 Reproduzierbarkeit

	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk	Bereich (ng/ml)	Inter-Assay-Vk
Metanephrin	110 - 414	10,3 - 9,9 %	208 - 1964	10,1 - 14,8 %
Normetanephrin	63 - 1323	7,2 - 4,8 %	120 - 2963	5,3 - 10,1 %

9.6 Methodenvergleich

	Vergleichsmethode	Korrelation
Metanephrin	HPLC	$Y = 0,89 \times LC/MS - 2$; $R = 0,99$; $N = 32$
Normetanephrin	HPLC	$Y = 1,01 \times LC/MS - 20$; $R = 0,98$; $N = 32$

9.7 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch die Zugabe einer definierten Metanephrin- und Normetanephrin Stammlösung.

9.8 Grenzen der Methode

Ergebnisse sind nur für Forschungszwecke geeignet.

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit dem Standard 1 verdünnt und erneut bestimmt werden. Die Werte von verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

9.9 Interferenzen

Nicht angesäuerte Sammelurine nicht verwenden (s. 5. Probengewinnung und -lagerung)

Pipettierschema Probenvorbereitung (Metanephrin und Normetanephrin)

		Standard	Kontrolle	Urin
Standard 1 - 6	µl	10		
Kontrolle 1 & 2	µl		10	
Urin	µl			10
Salzsäure	µl	100	100	100

Röhrchen verschließen und vortexen

30 Minuten bei 90 - 100 °C inkubieren *
Auf Raumtemperatur bringen, kurz zentrifugieren *

Deckel werfen

Acyl. Puffer	µl	25	25	25
---------------------	----	----	----	----

Kurz schütteln

Acyl. Reagenz	µl	20	20	20
----------------------	----	----	----	----

Acylierungsreagenz einzeln zugeben und einzeln sofort vortexen,
dann erst mit dem nächsten Röhrchen fortfahren

15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

Dest. Wasser	µl	500	500	500
---------------------	----	-----	-----	-----

vortexen

50 µl im Metanephrin ELISA einsetzen

20 µl im Normetanephrin ELISA einsetzen

* entfällt bei der Bestimmung des freien Metanephrin und Normetanephrin

Pipettierschema Metanephrin ELISA

	Standard	Kontrolle	Probe
Acyl. Standard μl	50		
Acyl. Kontrolle μl		50	
Acyl. Probe μl			50
Metanephrin Antiserum μl	50	50	50

Platte mit Haftklebefolie abkleben

1 Stunde bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Enzymkonjugat μl	100	100	100
------------------------------------	-----	-----	-----

20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Substrat μl	100	100	100
-------------------------------	-----	-----	-----

20 $\pm$ 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung μl	100	100	100
----------------------------------	-----	-----	-----

Platte mindestens 10 Sekunden schütteln

Messung der Extinktion bei 450 nm

Pipettierschema Normetanephrin ELISA

	Standard	Kontrolle	Probe
Acyl. Standard μl	20		
Acyl. Kontrolle μl		20	
Acyl. Probe μl			20
Normetanephrin Antiserum μl	50	50	50

Platte mit Haftklebefolie abkleben

1 Stunde bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Enzymkonjugat μl	100	100	100
------------------------------------	-----	-----	-----

20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Substrat μl	100	100	100
-------------------------------	-----	-----	-----

20 $\pm$ 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung μl	100	100	100
----------------------------------	-----	-----	-----

Platte mindestens 10 Sekunden schütteln

Messung der Extinktion bei 450 nm

