

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## User's Manual

# VMA ELISA

*Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of  
Vanillylmandelic Acid (VMA) in human urine*



**DE1620**



**96 wells**

**Table of Contents**

1	NAME AND INTENDED USE .....	3
2	PRINCIPLE OF THE ASSAY.....	3
3	MATERIALS PROVIDED IN THE KIT .....	4
4	MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED .....	4
5	PREPARATION FOR THE ASSAY .....	4
6	WARNING AND PRECAUTION .....	4
7	STORAGE AND STABILITY.....	4
8	SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING .....	5
9	ASSAY PROCEDURE.....	5
10	PROCEDURAL NOTE.....	8
11	LIMITATIONS .....	8
12	QUALITY CONTROL.....	8
13	EXPECTED VALUES .....	9
14	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	10

**Inhaltsverzeichnis**

1	VERWENDUNGSZWECK .....	12
2	TESTPRINZIP .....	12
3	PACKUNGSINHALT .....	12
4	NICHT IM KIT ENTHALTENE ABER ERFORDERLICHE REAGENZIEN .....	12
5	VORBEREITUNGEN VOR DER TESTDURCHFÜHRUNG.....	13
6	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	13
7	LAGERUNG UND HALTBARKEIT DES KITS .....	13
8	PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG .....	13
9	TESTDURCHFÜHRUNG.....	13
10	ALLGEMEINE HINWEISE .....	15
11	GRENZEN DES TESTES.....	15
12	QUALITÄTS-KONTROLLE.....	15
13	ERWARTETE WERTE .....	15
14	TEST-CHARAKTERISTIKA.....	15

**Tabla de Contenidos**

1	NOMBRE Y FINALIDAD.....	16
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO.....	16
3	MATERIALES PROVISTOS EN EL KIT .....	17
4	MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS.....	17
5	PREPARACIÓN PARA EL ENSAYO.....	17
6	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES .....	17
7	ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD .....	17
8	RECOGIDA DE MUESTRAS Y MANEJO .....	18
9	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO .....	18
10	NOTAS DEL PROCEDIMIENTO .....	20
11	LIMITACIONES .....	21
12	CONTROL DE CALIDAD.....	21
13	VALORES ESPERADOS .....	21
14	CARACTERÍSTICAS DE EJECUCIÓN .....	21
15	REFERENCES /LITERATUR / REFERENCIAS.....	24
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAY'S .....	25

## 1 NAME AND INTENDED USE

The VMA ELISA is designed for in vitro quantitative measurement of vanillylmandelic acid (VMA) concentration in patients' urine.

**For in vitro diagnostic use only.**

### 1.1 Background

Among spectrophotometric procedures the most widely used procedure was developed by Pisano et al (1) measuring vanillin directly at 360 nm. The colorimetric methods in general, however, suffer from interfering compounds and intensive labor requiring a number of manual steps. The use of paper chromatographic methods (2,3) employing diazotized p-nitroaniline and a thin layer chromatographic (TLC) procedure on silica gel (4) were reported for the analysis of extracted VMA but are considered to be of only historical interest. More recently, high performance liquid chromatography (HPLC) procedures are reported using a variety of detectors including ultraviolet light (5-7), amperometric detection (8-11), and postcolumn reaction (12, 13). These procedures are considered to be a considerable improvement for overall specificity and sensitivity of analysis.

### 1.2 SUMMARY AND EXPLANATION

Catecholamines include dopamine (found mostly in the central nervous system), norepinephrine (mainly in the sympathetic nervous system) and epinephrine (mainly in the adrenal medulla). They are stored as inactive complex. Released catecholamines, having a short half-life, are taken up by sympathetic nerve endings, or metabolized by the liver and kidney and excreted.

Vanillylmandelic acid (VMA) and 4-hydroxy-3-methoxy-mandelic acid (HMMA) are the end product of both epinephrine and norepinephrine catabolism. Quantitation of the acidic metabolites has long proven to be a reliable diagnostic as well as commonly used follow-up procedure for pheochromocytoma and other catecholamine-, producing tumors (14-16). The prevalence of pheochromocytoma is 0.1% to 0.2% of hypertensive patients (17, 18). Pheochromocytomas have a long record of misdiagnosis due to the metabolic, cardiac and gastrointestinal symptoms that can mimic many other diseases. Undetected, or mistreated it can be fatal. However, since this is a surgically curable disease, early diagnosis by demonstration of excess VMA excretion is critically important.

## 2 PRINCIPLE OF THE ASSAY

The VMA ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the competition between VMA coated on a microtiter well and that in urine for the monoclonal antibody. Outlined steps are:

1. *Sampling and reaction:* The samples are incubated in the wells with horseradish peroxidase conjugated anti-VMA monoclonal antibody.
2. *Washing:* Unbound VMA and the antibody bound to urinary VMA are removed by washing with 0.9% NaCl solution.
3. *Enzyme Reaction (Color Development):* The amount of bound peroxidase is inversely proportional to the concentration of the VMA present in the urine sample. Upon addition of the substrate (TMB), a blue color is developed, then it is changed to yellow by adding Stopping Solution. The intensity of this is inversely proportional to the concentration of VMA in the Calibrator or urine sample.
4. *Absorbance Detection:* After addition of Stopping Solution, absorbance is measured at 450 nm. And the readings are converted into the concentrations from the Calibration curve.

### 3 MATERIALS PROVIDED IN THE KIT

1. VMA Coated **Microwell Plate**:  
1 VMA coated 96-microwell plate.
2. **Anti-VMA-Enzyme Conjugate**:  
Horseradish peroxidase conjugated to an anti-VMA monoclonal antibody, 10 ml.
3. **VMA Color Developing Reagent**:  
Tetramethylbenzidine (TMB) solution, 20 ml.
4. **VMA Stopping Solution**:  
Mixture of acidic solution and Hydrochloric Acids (20 ml)
5. **VMA Calibrators**:  
of 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 1, 2, 4 and 8 µg/ml  
in phosphate buffered saline, 0.01M, pH 7.4 (1.0 ml each).

### 4 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Plate reader with 450 nm filter
2. pH meter or pH paper with the range of 5.0-10.0
3. Pipettor with tips for 10, 50, and 100 µl
4. Pipettor with tips for 50 and 100 µl
5. Volumetric cylinders, 10 and 100 ml
6. Volumetric and serological pipettes, 10 ml
7. Disposable test tubes or vials
8. 5N NaOH solution
9. 5N HCl solution
10. Plate washer (optional)
11. Plate shaker (optional)
12. Sodium Chloride or Saline Solution
13. 0.01M phosphate buffered saline, pH 7.4

### 5 PREPARATION FOR THE ASSAY

1. Prepare 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.4.  
This solution is used to dilute all unknown urine samples prior to analysis.
2. Before beginning the test, bring all urine samples and reagents to room temperature (15-30 °C) and mix well.
3. Set up all reagents and urine samples before running the assay. The entire test procedure must be performed without any interruption in order to get the most reliable and consistent results.

### 6 WARNING AND PRECAUTION

- The VMA KIT is designed for in vitro use only.
- The components in this kit are intended for use as an integral unit.
- The components of different lots should not be mixed.
- Do not use the VMA Calibrators in this kit for other purposes (e.g. HPLC).
- Use a new pipette tip for each Calibrator or urine sample to avoid cross-contamination.

### 7 STORAGE AND STABILITY

- Store the kits at 2-8°C in refrigerator.
- Keep microwell plates in dry bag with desiccants. Open the bag only when needed.
- Expiration dates of the reagents are stated on their labels.
- Color Developing Reagent should be colorless.
- Protect the reagents and reaction mixture from exposure to direct sunlight.

## 8 SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

A 24-hour urine specimen should be collected with 10 ml of 6 M HCl as a preservative.

Overnight or randomly collected urine should be acidified to a pH between 2 and 3 immediately after collection. Record the total volume and save 1-5 ml for the analysis of VMA and total creatinine.

All samples should be refrigerated until tested. Centrifuge turbid urine samples containing crystals or sediment.

## 9 ASSAY PROCEDURE

### 9.1 Preparation of Reagents.

#### Washing Solution:

Dissolve 9 grams of NaCl in 1 liter of deionized or distilled water. Commercially available normal saline can also be used.

### 9.2 Preparation of Samples

1. Take 1.0 ml of acidified urine and transfer to a disposable tube in which the pH of urine sample can be readjusted.
2. Bring pH of all samples within the range of 6 and 9 by stepwise addition of small amounts of 5N NaOH (e.g. 5 µl) while checking pH either with a pH meter or using pH paper.
3. Dilute pH re-adjusted samples at a 1:10 ratio with phosphate buffered saline. The pH for diluted samples should be between 7.0 and 8.0.

### 9.3 Standard Procedure for the Assay

1. Make work sheet with Calibrators and sample identification.
2. *Sampling:*
  - a. Dispense 50 µl of VMA Calibrators into appropriately designated wells.
  - b. Dispense 50 µl diluted (1:10) controls or samples to respective wells.
3. *Addition of the Anti-VMA-Enzyme Conjugate:*

Dispense 50 µl of Anti-VMA-Enzyme Conjugate to each well, using a pipettor.
4. *Antigen-Antibody Reaction:*

Mix the plate by moving it back and forth slow horizontal movements for a minute. A plate shaker can be used for this purpose also. Allow the plate to stand at 15-30°C, room temperature for 1 hour.
5. *Washing:*

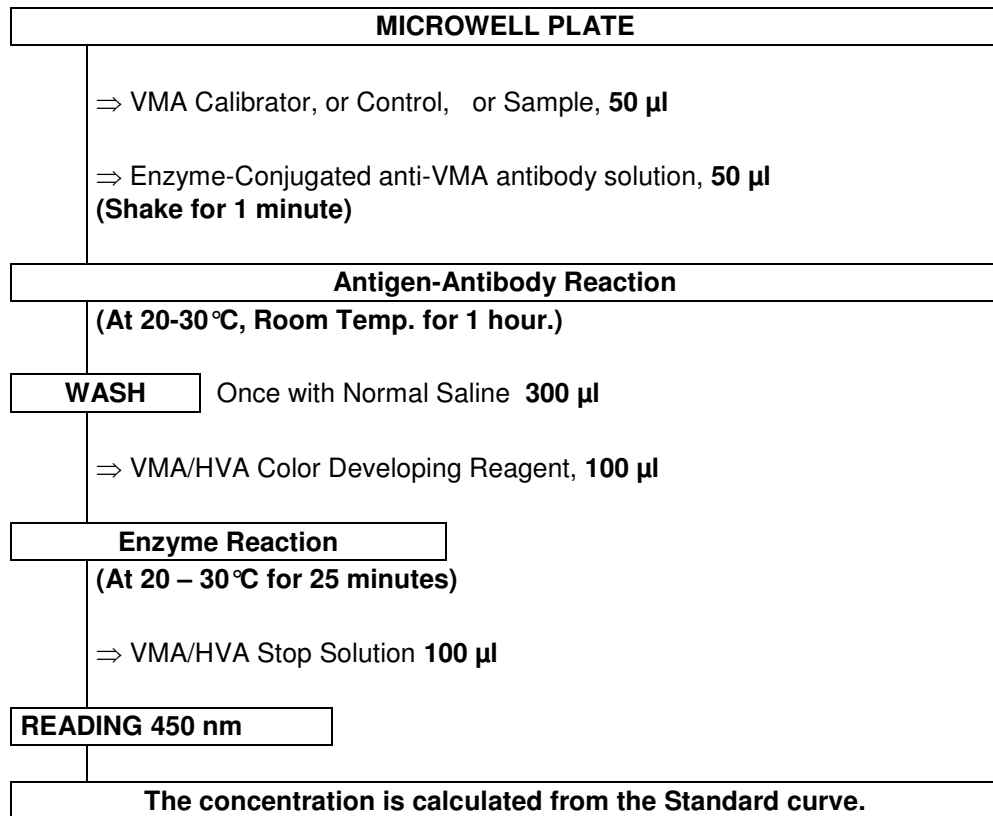
**Wash only once.** Removing incubation mixture by decanting the plate into a sink and blotting the plate on absorbent paper.  
Dispense 300 µl of normal saline into each well. Remove saline by decanting the plate and blotting it on absorbent paper. This also can be done by a plate washer.
6. *Enzyme Reaction:*

Dispense 100 µl of Color Developing Reagent to the well and allow it to stand at 15-30°C, room temperature for 25 minutes.
7. *Stopping Color Development:*

Dispense 100 µl of Stop Solution to the wells.
8. *Absorbance Measurement:*

Any microwell reader capable of detecting absorbance at 450nm may be used.

## PROCEDURE SUMMARY FLOW DIAGRAM

**9.4 Calculation of Results**

- Using semi-log linear paper (Fig. 3) or log-logit paper (fig. 4) the Calibration curve is generated by plotting VMA concentrations on the abscissa and the absorbance on the ordinate. VMA concentration for each unknown sample is obtained from the Calibration curve.

For example:

Description	Absorbance (450 nm)		Average of B/Bo(%)	VMA (µg/ml)
VMA Calibrator (µg/ml)				
0	1.487	1.466	100.0	
0.0625	1.255	1.258	85.1	
0.125	1.037	1.052	70.7	
0.25	0.818	0.839	56.1	
1	0.359	0.378	25.0	
2	0.245	0.261	17.1	
4	0.145	0.145	9.8	
8	0.078	0.084	5.5	
Sample A	1.299	1.218	82.9	0.072 x 10
Sample B	0.769	0.746	51.3	0.285 x 10
Sample C	0.522	0.522	35.4	0.600 x 10

The results obtained above indicate VMA concentration in µg/ml. When the total VMA in 24-hour urine sample is required;

$$\text{VMA } (\mu\text{g/ml}) \times \frac{\text{urine volume (ml)}}{1000} = \text{VMA mg / 24 hours}$$

or, when VMA/Creatinine value is required;

$$\text{VMA } (\mu\text{g/ml}) \div \frac{\text{Creatinine (mg/dl)}}{100} = \text{VMA } \mu\text{g/ml Creatinine or}$$

$$= \text{VMA mg/g Creatinine}$$

- Calculation can be made with a computer set so as to draw calibration curves based on 4 coefficient log-logit.

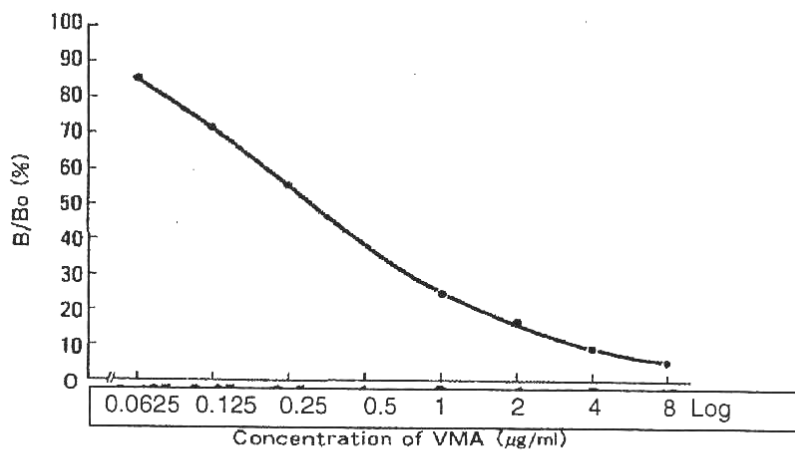


Fig.3 Calibration curve of VMA using semi-log linear paper

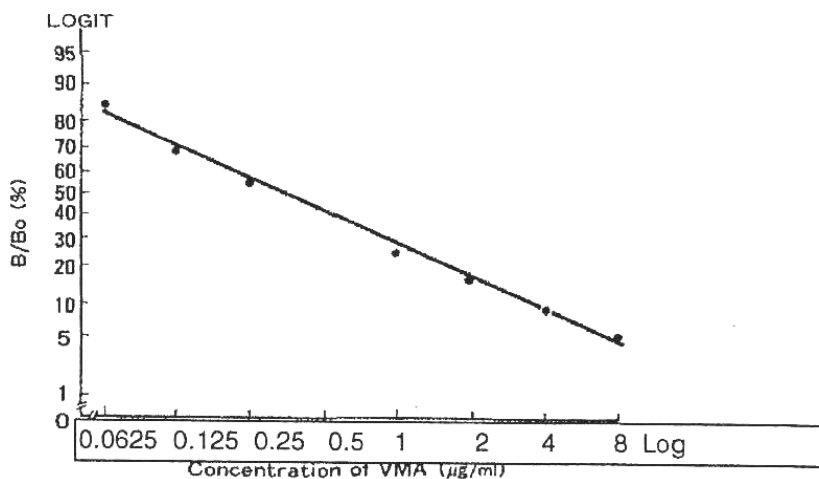


Fig.4 Calibration curve of VMA using log-logit linear paper

**NOTE:** This is a representative curve and should not be used to calculate results for unknown samples.

## 10 PROCEDURAL NOTE

1. It is very important to wash the microwells thoroughly, yet uniformly and remove any residual liquid from the wells to achieve optimal results.
2. Pipette Calibrators or urine samples into the bottom of each well. Vortex-mixing or shaking of wells after each pipetting is not required.
3. Absorbance is a function of the incubation time and temperature. It is, therefore, recommended to ensure the equally elapsed time for each pipetting without interruption.

## 11 LIMITATIONS

1. This VMA ELISA kit is designed for the quantitative determination of VMA in urine only.
2. All samples with VMA concentrations greater than 8 µl/ml should be repeated on much larger dilution(s), e.g. 1:20 or more.
3. Interference by Sodium Azide: As Sodium Azide inhibits the enzyme reaction, urine or any buffer used to dilute urine samples containing sodium azide as an antiseptic can not be used.

## 12 QUALITY CONTROL

In order to monitor precision of the analytical performance, it is recommended that commercially available urine control samples be included in every run.

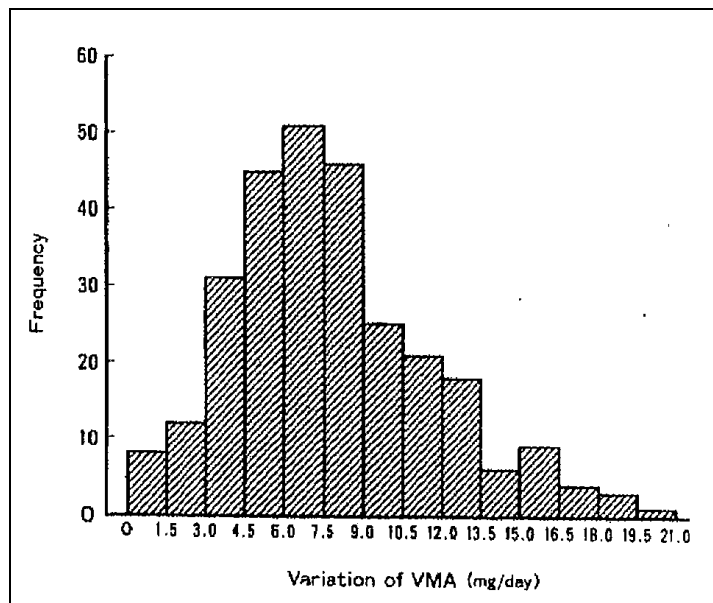


### 13 EXPECTED VALUES

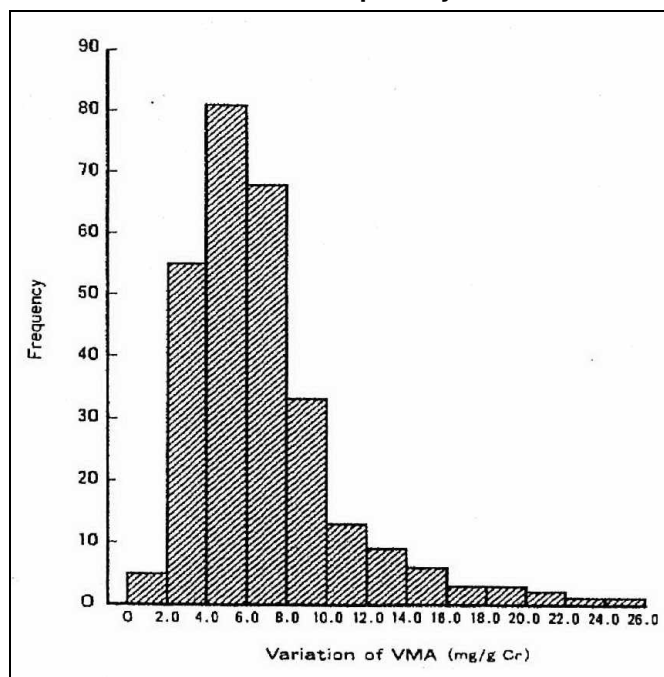
Each laboratory should determine a normal range to conform to the characteristics of the population being tested. The range given here was determined from 24-hour urine collections on 280 subjects.

Urinary creatinine was measured on Astra to assess the completeness of each collection, and mg VMA per gram creatinine was calculated.

	VMA mg/day	VMA mg/g Creatinine
<b>Number of samples (n)</b>	280	280
<b>Mean Value (x)</b>	7.92	6.87
<b>± 2 S.S. range</b>	0.40 – 15.44	0.00 – 14.37
<b>Reference Range</b>	up to 15.0	up to 14.0
	(Fig. 5)	(Fig. 6)



**Fig. 5** Distribution of total VMA excretion per day in 280 cases of normal controls.



**Fig. 6** Distribution of total VMA concentration per day in 280 cases of normal controls.

## 14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 14.1 Recovery

Recovery studies were performed in urine samples from four healthy adults, to which VMA was added at various concentrations. Recovery was determined by dividing observed value by expected value for each prepared sample.

Sample	Baseline (µg/ml)	Added (µg/ml)	Expected Value (µg/ml)	Observed Value (µg/ml)	Recovery (%)
A	1.76	0.00			
	0.88	9.60	10.48	10.10	96
	1.32	4.80	6.12	5.92	97
	1.54	2.40	3.94	3.90	99
	1.65	1.20	2.85	2.78	98
B	6.16	0.00			
	3.08	9.60	12.68	12.85	101
	4.62	4.80	9.42	9.55	101
	5.39	2.40	7.79	8.00	102
	5.77	1.20	6.97	7.29	104
C	11.71	0.00			
	5.85	9.60	15.45	15.85	102
	8.78	4.80	13.58	18.77	101
	10.24	2.40	12.64	12.61	99
	10.98	1.20	12.18	13.30	109
D	8.43	0.00			
	4.21	9.60	13.81	15.14	109
	6.32	4.80	11.12	11.34	102
	7.37	2.40	9.77	10.34	105
	7.90	1.20	9.10	9.27	101

### 14.2 Linearity and Parallelism

Four urine samples and two commercial urine controls Lyphochek 1 and 2 (Bio-Rad) were serially diluted with phosphate buffered saline.

The ratio (B/Bo) of absorbance for each dilution (B) to the absorbance of 0 µg/ml Calibrator (Bo) was calculated and plotted on log-logit paper.

### 14.3 Precision

#### 14.3.1 Intra-assay

Intra-assay coefficient of variation was evaluated in three urine samples at different VMA concentrations.

Intra-Assay	Sample A	Sample B	Sample C
<b>N</b>	26	24	24
<b>Mean (µg/ml)</b>	0.96	8.25	11.24
<b>S.D. (µg/ml)</b>	0.06	0.52	0.71
<b>C.V. (%)</b>	6.0	6.3	6.0

#### 14.3.2 Inter-assay

Inter-assay coefficient of variation was evaluated at three different concentrations, by analyzing the samples in 16 to 19 separate occasions.

Inter-Assay	VMA 1	VMA 2	VMA 3
<b>N</b>	16	19	19
<b>Mean (µg/ml)</b>	1.193	2.821	9.698
<b>S.D (µg/ml)</b>	0.086	0.232	0.686
<b>C.V. (%)</b>	5.7	8.2	7.1

#### 14.4 Specificity

The following substances were tested for cross-reactivity of the assay. Cross-reactivity is expressed in terms of percentage of the concentration of each substance that produced 50% displacement.

Substance	Cross-reactivity (%)
	VMA
Vanillylmandelic Acid	100
Homovanillic Acid	<0.01
DL-3,4-Dihydroxymandelic Acid	4
3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid	<0.01
Metanephrine	<0.01
Vanillylpyruvic Acid	4
Vanillic acid	<0.01
Dopamine	<0.01
5-Hydroxy-3-indolacetic Acid	<0.01
Vanillyllactic Acid	<0.01
3-methoxy-4-hydroxyphenyl Glycol	<0.01

#### 14.5 Sensitivity

The sensitivity of this test is higher than 0.0625 µg/ml. The minimal detectable concentration of VMA is estimated to be 0.035 µg/ml. The minimal detectable concentration is defined as the concentration of VMA which corresponds to the absorbance that is two standard deviations from the mean absorbance of 20 determinations of zero dose VMA.

#### 14.6 Sample Stability

Sample stability was studied in two different urine samples at 4 °C and -20 °C for up to 5 days and 50 days, respectively. The results confirm that VMA is stable at 4 °C storage at least for 5 days tested, and for up to 50 days tested when stored at -20 °C.

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Vanillinmandelsäure (vanillylmandelic acid (VMA) in humanem Urin.

### Nur für in-vitro Diagnostik.

Vanillinmandelsäure ist das Hauptabbauprodukt der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin und wird im Urin ausgeschieden. Die Bestimmung der VMA ist ein zuverlässiger Suchtest in der Hypertoniediagnostik. VMA wird vor allem bei hormonell aktivem Phäochromozytom vermehrt im Urin ausgeschieden, unter Umständen bei Neuroblastom, schwerer Herzinsuffizienz, in Stresssituationen u.a.

## 2 TESTPRINZIP

Der VMA ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit VMA beschichtet.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Enzymkonjugat inkubiert. Dieses Konjugat enthält monoklonale anti-VMA-Antikörper, mit Meerrettichperoxidase konjugiert.

Ungebundene VMA und Antikörper, die sich an in der Urinprobe enthaltene VMA gebunden haben, werden durch einen Waschschriff entfernt.

Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der VMA -Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

## 3 PACKUNGSINHALT

1. **Microwell Plate (Mikrotiterplatte)**, 96 Wells, Mit Vanillinmandelsäure (VMA) beschichtet.
2. **Enzyme Conjugate (Anti-VMA-Enzymkonjugat)**, 1 Fläschchen, 10 ml, Anti-VMA-Antiserum mit Meerrettichperoxidase konjugiert
3. **Color Develing Reagent** :, 1 Fläschchen, 20 ml, gebrauchsfertig Substratlösung TMB zur Farbentwicklung
4. **Stopping Solution (Stopplösung)**, 1 Fläschchen, 20 ml, gebrauchsfertig, enthält eine Mischung aus saurer Lösung und HCl Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
5. **Calibrator**, 8 Fläschchen, je 1 ml, gebrauchsfertig Konzentrationen: 0 – 0,0625 - 0,125 – 0,25 – 1 – 2 – 4 und 8 µg/ml VMA

## 4 NICHT IM KIT ENTHALTENE ABER ERFORDERLICHE REAGENZIEN

1. Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter
2. Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
3. pH-Meter oder pH-Papier mit einem Messbereich von 5,0 – 10,0
4. Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
5. Messzylinder, 10 ml und 100 ml
6. Pipetten für 10 ml
7. Einmal-Röhrchen oder -Gefäße
8. 5N NaOH
9. 5N HCl
10. Mikrotiterplatten-Waschgerät (optional)
11. Mikrotiterplatten-Schüttler (optional)
12. NaCl (für Waschlösung)
13. 0,01 M phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7.4 (zur Probenverdünnung)

## 5 VORBEREITUNGEN VOR DER TESTDURCHFÜHRUNG

1. Herstellen einer 0,01 M phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7.4.  
Diese Lösung wird benötigt um alle Urinproben vor der Testdurchführung zu verdünnen.
2. Alle Proben und die Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (15-30°C) gebracht werden.
3. Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.

## 6 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.

## 7 LAGERUNG UND HALTBARKEIT DES KITS

- Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.
- Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden.
- Die Mikrotiterwells sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.
- Das Farbreagenz „Color Devel. Reagent“ muss farblos sein.
- Alle Reagenzien vor direktem Sonnenlicht schützen.

## 8 PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Es sollte 24-Stunden-Urin gesammelt werden in Behälter mit 10 ml 6 M HCl als Konservierungsmittel.

Sammelurin sollte so schnell wie möglich angesäuert werden: auf pH 2 – pH 3 einstellen.

Gesamtvolumen bestimmen; 1 – 5 ml für die -Bestimmung der VMA und des Gesamt-Kreatinin verwenden.

Alle Proben bis zum Testbeginn bei 2 – 8°C lagern. Trübe Urinproben sollten vor Testbeginn zentrifugiert werden.

## 9 TESTDURCHFÜHRUNG

### 9.1 Vorbereitung der Reagenzien

#### Waschlösung

9 g NaCl in 1 Liter destilliertem Wasser auflösen (0,9% NaCl).

### 9.2 Vorbereitung der Proben

1. 1 ml angesäuerten Urin in ein Röhrchen geben, in dem der pH der Urinprobe neu eingestellt werden kann.
2. Alle Proben auf einen pH-Wert im Bereich von pH 6 – 9 einstellen; durch stufenweise Zugabe geringer Mengen (z.B. 5 µl) 5N NaOH.
3. Eingestellte Proben 1:10 mit PBS verdünnen. Der pH-Wert der verdünnten Proben sollte zwischen 7,0 und 8,0 liegen.

### 9.3 Testdurchführung

1. **50 µl** Standards, verdünnte (1:10) Urinproben oder Kontrollen in die entsprechenden Wells pipettieren.
2. **50 µl** Enzymkonjugat in jedes Well pipettieren
3. Platte vorsichtig 60 Sek. mischen. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.  
Wells einmal mit Waschlösung (300 µl/Well) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
6. **100 µl** Color Developing Reagent (Substratlösung) in jedes Well geben.
7. **25 Minuten** bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µl** Stopplösung in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei 450±10 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der Stop Solution bestimmen.

### 9.4 Berechnung der Ergebnisse

Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optische Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die HVA-Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird. (semi-log linear-Papier oder log-logit-Papier).

Unter Verwendung der (mittleren) OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt. Der Verdünnungsfaktor (1:10) muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

**Beispiel:** Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Beschreibung	Optische Dichte (450 nm)		Mittelwert B/Bo(%)	VMA (µg/ml)
VMA Standard (µg/ml)				
0	1.487	1.466	100.0	
0.0625	1.255	1.258	85.1	
0.125	1.037	1.052	70.7	
0.25	0.818	0.839	56.1	
1	0.359	0.378	25.0	
2	0.245	0.261	17.1	
4	0.145	0.145	9.8	
8	0.078	0.084	5.5	
Probe A	1.299	1.218	82.9	0.072 x 10
Probe B	0.769	0.746	51.3	0.285 x 10
Probe C	0.522	0.522	35.4	0.600 x 10

Im obigen Beispiel sind die VMA-Konzentrationen in µg/ml angegeben. Die Gesamt-VMA-Menge im 24-Stunden-Urrin wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{VMA } (\mu\text{g/ml}) \times \frac{\text{Urinvolumen (ml)}}{1000} = \text{VMA mg/24 Stunden}$$

oder, wenn der VMA / Kreatinin-Wert benötigt wird;

$$\text{VMA } (\mu\text{g/ml}) \div \frac{\text{Kreatinin (mg/dl)}}{100} = \text{VMA } \mu\text{g/ml Kreatinin oder} \\ = \text{VMA mg/g Kreatinin}$$

Eine automatische Auswertung kann erfolgen mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4 PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard).

**10 ALLGEMEINE HINWEISE**

Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!

Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.

**11 GRENZEN DES TESTES**

1. Der VMA ELISA ist nur konzipiert zur Bestimmung der Vanillinmandelsäure in Urinproben.
2. Proben mit Konzentration über 8 µg/ml müssen höher vorverdünnt werden (z.B. 1:20 oder höher).
3. Natriumazid stört die Enzymreaktion. Urin oder Pufferlösungen zur Probenverdünnung, die Natriumazid enthalten, können nicht verwendet werden.

**12 QUALITÄTS-KONTROLLE**

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

**13 ERWARTETE WERTE**

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

Die hier angegebenen Werte wurden mit 24-Stunden-Urin ermittelt.

	VMA mg/Tag	VMA mg/g Kreatinin
<b>Anzahl der Proben (n)</b>	280	280
<b>Mittelwert</b>	7,92	6,87
<b>Bereich (± 2 Standardabw.)</b>	0,40 – 15,44	0,00 – 14,37
<b>Referenzbereich</b>	bis zu 15.0	bis zu 14.0

**14 TEST-CHARAKTERISTIKA**

Die Daten hierzu entnehmen Sie bitte der englischen Anleitung.

## 1 NOMBRE Y FINALIDAD

El VMA ELISA está diseñado para la cuantificación *in vitro* de la concentración de ácido vanililmandélico (VMA) en la orina de pacientes.

**Sólo para uso en diagnóstico *in vitro*.**

### 1.1 Historia

De todos los métodos espectrofotométricos para la medida de vanilina, el más usado es la medida directa a 360nm, desarrollado por Pisano y colaboradores (1). Sin embargo, los métodos colorimétricos, en general, sufren interferencias por otros compuestos y requieren, así mismo, un intenso trabajo consistente en ciertos pasos manuales. Se ha descrito también para el análisis de la VMA extraída, el uso de métodos cromatográficos en papel (2,3) que emplean p-nitroanilina diazotizada y cromatografía de capa fina (TLC) realizada en gel de sílice (4), pero simplemente son de interés histórico. Más recientemente, se han descrito el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una gran variedad de detectores entre los que se incluyen: la luz ultravioleta (5-7), la detección amperométrica (8-11), y la reacción poscolumna (12,13). Estos procedimientos se consideran una gran mejora por su alta especificidad y sensibilidad de análisis.

### 1.2 Resumen y justificación

Las catecolaminas incluyen la dopamina (que se encuentra mayormente en el sistema nervioso central), norepinefrina (sistema nervioso simpático) y epinefrina (médula adrenal). Se almacenan como complejos inactivos. Las catecolaminas liberadas, que tienen una vida media corta, son captadas por los terminales nerviosos simpáticos o metabolizadas en el hígado y en el riñón y excretadas.

El ácido vanililmandélico (VMA) y el ácido 4-hidroxi-3-metoxi-mandélico (HMMA) son los productos finales del catabolismo de la epinefrina y la norepinefrina. Se ha comprobado, desde hace mucho, que la cuantificación de los metabolitos ácidos es un diagnóstico fiable así como un procedimiento comúnmente usado para el seguimiento de los feocromocitomas y otros tumores que producen catecolaminas (14-16). La prevalencia del feocromocitoma es de 0.1% a 0.2% de pacientes hipertensos (17, 18). Los feocromocitomas presentan un gran record de mal diagnóstico debido a que los síntomas metabólicos, cardiacos y gastrointestinales pueden mimetizar otras enfermedades. Pueden ser fatales si no se detectan o se diagnostican erróneamente. Sin embargo, ya que es una enfermedad curable mediante cirugía, es de importancia crítica un diagnóstico precoz manifestado por un exceso de excreción de VMA.

## 2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El VMA ELISA es un ensayo inmunoabsorbente en fase sólida ligado a enzima (ELISA) basado en la competencia que se establece entre la VMA que recubre los pocillos de una microplaca y la VMA presente en la orina por un anticuerpo monoclonal. Los pasos resumidos son:

1. Toma de muestras y reacción: Las muestras se incuban en los pocillos con anticuerpo monoclonal anti-VMA conjugado con peroxidasa de rábano.
2. Lavado: Se eliminan mediante lavado con una solución de NaCl 0.9%, la VMA no unida y el anticuerpo unido a la VMA de la orina.
3. Reacción enzimática (Desarrollo del Color): La cantidad de peroxidasa unida es inversamente proporcional a la concentración de VMA presente en la muestra de orina. Con la adición del sustrato (TMB), se desarrolla un color azul, que cambia a amarillo cuando se añade la solución de parada. La intensidad de este es inversamente proporcional a la concentración de VMA en el calibrador o en la muestra de orina.
4. Detección de la Absorbancia: Después de la adición de la solución de parada, se mide la absorbancia a 450nm. Y las lecturas se convierten a concentraciones a partir de la curva de calibrado.



### 3 MATERIALES PROVISTOS EN EL KIT

1. **Microwell Plate (Microplaca)** recubierta con VMA:  
1 microplaca de 96 pocillos recubierta con VMA.
2. **Calibrator Set (Set de Calibración)** VMA:  
de 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 1, 2, 4 y 8 µg/ml  
en tampón fosfato salino, 0.01M, pH 7.4 (1.0 ml de cada uno).
3. **Enzyme Conjugate (Conjugado Enzima)-Anti-VMA:**  
Peroxidasa de rábano conjugada a un anticuerpo monoclonal anti-VMA, 10ml.
4. **Developing Reagent (Reactivo para el desarrollo del color)** VMA:  
Solución de Tetrametilbenidina (TMB), 20 ml.
5. **Stopping solution (Solución de Parada)** VMA:  
Solución de ácido sulfúrico / HCl (20 ml)

### 4 MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Lector de microplacas con filtro de 450 nm
2. pH metro o papel indicador de pH con rango de 5.0-10.0
3. Pipetas con puntas para 10, 50, y 100 µl
4. Pipetas con puntas para 50 y 100 µl
5. Probetas, 10 y 100 ml
6. Pipetas volumétricas y serológicas, 10 ml
7. Viales y tubos de ensayo desechables
8. Solución NaOH 5N
9. Solución HCl 5N
10. Lavador de placas (opcional)
11. Agitador de placas (opcional)
12. Solución salina o Cloruro Sódico
13. Tampón fosfato salino 0.01M, pH 7.4

### 5 PREPARACIÓN PARA EL ENSAYO

1. Preparar tampón fosfato salino 0.01, pH 7.4.  
Esta solución se usa para diluir todas las muestras de orina antes de su análisis.
2. Antes de comenzar el ensayo, dejar que alcancen la temperatura ambiente todas las muestras de orina y los reactivos (15-30 °C) y mezclar bien.
3. Preparar todos los reactivos y las muestras de orina antes de comenzar el ensayo. Todo el procedimiento de ensayo debe ser realizado sin interrupción para conseguir resultados fiables y consistentes.

### 6 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- El kit VMA está diseñado para su uso *in vitro* exclusivamente.
- Los componentes de este kit están proyectados para su uso como una unidad integral.
- No deben mezclarse componentes procedentes de diferentes lotes.
- No usar los calibradores de VMA de este kit para otros propósitos (Ej. HPLC).
- Utilizar puntas nuevas para cada calibrador o muestra de orina para evitar contaminación cruzada.

### 7 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Almacenar los kits a 2-8 °C en la nevera.
- Mantener las microplacas en bolsa seca con desecantes. Abrir la bolsa solo cuando sea necesario.
- Las fechas de caducidad de los reactivos están marcadas en sus etiquetas.
- El reactivo de desarrollo del color debe ser incoloro.
- Proteger los reactivos y las mezclas de reacción de la exposición directa a la luz solar.

## 8 RECOGIDA DE MUESTRAS Y MANEJO

Debe recogerse una muestra de orina de 24-horas con 10 ml de HCl 6M como conservante.

La orina recogida de la noche o al azar debe acidificarse a pH entre 2 y 3 inmediatamente después de su recogida. Anotar el volumen total y guardar de 1-5ml para el ensayo de VMA y de creatinina total.

Todas las muestras deben guardarse refrigeradas hasta el ensayo. Centrifugar las muestras de orina turbias que contengan cristales o sedimentos.

## 9 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

### 9.1 Preparación de los Reactivos.

#### Solución de Lavado:

Disolver 9 gramos de NaCl en 1 litro de agua desionizada o destilada. También puede utilizarse solución salina normal comercialmente disponible.

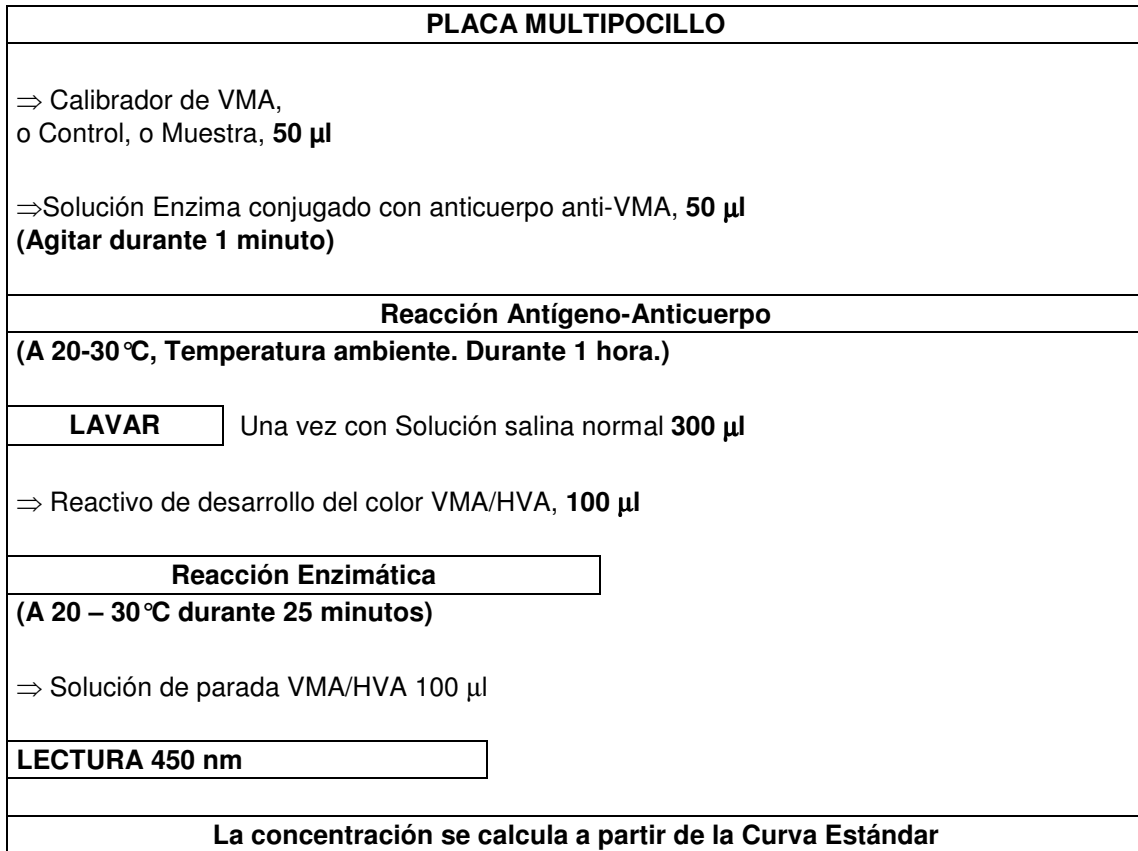
### 9.2 Preparación de las muestras

1. Tomar 1.0 ml de la orina acidificada y transferirla a un tubo desechable donde puede reajustarse el pH de la muestra de orina.
2. Llevar el pH de todas las muestras al rango de 6 y 9 mediante la adición paso a paso de pequeñas cantidades de NaOH 5N (Ej. 5 µl) mientras se chequea el pH con un pH-metro o utilizando papel indicador de pH.
3. Diluir las muestras en las que se ha reajustado el pH a una razón 1:10 ratio con tampón fosfato salino. El pH de las muestras diluidas debe estar entre 7.0 y 8.0.

### 9.3 Procedimiento estándar para el ensayo

1. Recoger en una hoja de trabajo la identificación de los calibradores y las muestras.
2. Muestreo:
  - a. Dispensar 50 µl de los calibradores de VMA a los pocillos designados.
  - b. Dispensar 50 µl de los controles o las muestras diluidas (1:10) a los pocillos respectivos.
3. Adición del Conjugado Enzima-anti-VMA:  
Dispensar 50 µl del conjugado enzima-anti-VMA a cada pocillo, utilizando una pipeta.
4. Reacción Antígeno-Anticuerpo:  
Mezclar la placa por movimientos lentos horizontales hacia adelante y hacia atrás durante un minuto. También puede utilizarse un agitador de placas. Incubar la placa a temperatura ambiente, 15-30 °C, durante 1 hora.
5. Lavado:  
**Lavar solo una vez.** Eliminar la mezcla de incubación por decantación de la placa en un fregadero y secarla sobre papel absorbente.  
Dispensar 300 µl de solución salina normal a cada pocillo. Eliminar la solución salina por decantación de la placa y secar sobre papel absorbente. Esto puede hacerse con un lavador de placas.
6. Reacción Enzimática:  
Dispensar 100 µl del Reactivo de desarrollo del color VMA/HVA a cada pocillo e incubar a 15-30 °C, temperatura ambiente durante 25 minutos.
7. Parada del desarrollo del color:  
Dispensar 100 µl de la solución de parada VMA/HVA a los pocillos.
8. Medida de la Absorbancia:  
Se puede utilizar cualquier lector de microplacas capaz de detectar la absorbancia a 450nm.

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO. DIAGRAMA DE FLUJO



#### 9.4 Cálculo de los Resultados

- Utilizar el papel lineal semilogarítmico (Fig. 3) o el papel log-logit (fig. 4). La curva de Calibración se genera mediante la representación de las concentraciones de VMA en el eje de abscisas y la absorbancia en el de ordenadas. La concentración de VMA de cada muestra se obtiene a partir de la curva de calibración.

Por ejemplo:

Descripción	Absorbancia (450 nm)		Media de B/Bo (%)	VMA (µg/ml)
Calibrador VMA (µg/ml)				
0	1.487	1.466	100.0	
0.0625	1.255	1.258	85.1	
0.125	1.037	1.052	70.7	
0.25	0.818	0.839	56.1	
1	0.359	0.378	25.0	
2	0.245	0.261	17.1	
4	0.145	0.145	9.8	
8	0.078	0.084	5.5	
Muestra A	1.299	1.218	82.9	0.072 x 10
Muestra B	0.769	0.746	51.3	0.285 x 10
Muestra C	0.522	0.522	35.4	0.600 x 10

Los resultados obtenidos arriba indican la concentración de VMA en µg/ml. Cuando se requiere el valor de la VMA total en una orina de 24;

$$\text{VMA } (\mu\text{g/ml}) \times \frac{\text{Volumen de orina (ml)}}{1000} = \text{VMA mg/24 horas}$$

O, cuando se requiere el valor VMA/Creatinina;

$$\text{VMA } (\mu\text{g/ml}) \div \frac{\text{Creatinina (mg/dl)}}{100} = \text{VMA } \mu\text{g/ml Creatinina or}$$

$$= \text{VMA mg/g Creatinina}$$

- Los cálculos pueden realizarse con un ordenador para dibujar las curvas de calibración basadas en 4 coeficientes log-logit.

#### 10 NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

- Es muy importante lavar las placas completamente, dejarlas uniformes y eliminar cualquier líquido residual de los pocillos para obtener resultados óptimos.
- Pipetear los calibradores o las muestras de orina al fondo de cada pocillo. No se requiere mezclar con vortex o por agitación los pocillos después de cada pipeteo.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y de la temperatura. Se recomienda, por tanto, asegurarse de que todos los pipeteos se realizan en los mismos tiempos sin interrupción.

**11 LIMITACIONES**

1. Este Kit VMA ELISA se ha diseñado para la determinación cuantitativa de VMA en orina solamente.
2. Todas las muestras con concentraciones de VMA superiores a 8 µl/ml deben de repetirse a una dilución(es) mayor, Ej. 1:20 o mas.
3. Interferencia con Acida Sódica: Ya que la acida sódica inhibe la reacción enzimática, la orina o cualquier tampón usado para diluir las muestras de orina que contenga acida sódica como un antiséptico no puede utilizarse.

**12 CONTROL DE CALIDAD**

Con la finalidad de monitorizar la precisión de la medida analítica, se recomienda que se incluyan controles de orina comercialmente disponibles en cada ensayo.

**13 VALORES ESPERADOS**

Cada laboratorio debe determinar un rango normal para conformar las características de la población que se ensaya. El rango dado aquí se determinó a partir de orina de 24 horas procedente de 280 sujetos.

La creatinina urinaria se midió en Astra para asegurar la completitud de cada colección, y se calcularon los mg de VMA por gramo de creatinina.

	VMA mg/día	VMA mg/g Creatinina
<b>Número de muestras (n)</b>	280	280
<b>Valor Medio (x)</b>	7.92	6.87
<b>± 2 S.S. rango</b>	0.40 – 15.44	0.00 – 14.37
<b>Rango de Referencia</b>	hasta 15.0	hasta 14.0

**14 CARACTERÍSTICAS DE EJECUCIÓN****14.1 Precisión****14.1.1 Recuperación**

Los estudios de recuperación se llevaron a cabo en muestras de orina de cuatro adultos sanos, a las cuales se les añadieron varias concentraciones de VMA. La recuperación se determinó mediante la división de los valores observados por los esperados de cada muestra preparada.

Muestra	Línea Basal (µg/ml)	Añadido (µg/ml)	Valor Esperado (µg/ml)	Valor Observado (µg/ml)	Recuperación (%)
A	1.76	0.00			
	0.88	9.60	10.48	10.10	96
	1.32	4.80	6.12	5.92	97
	1.54	2.40	3.94	3.90	99
	1.65	1.20	2.85	2.78	98
B	6.16	0.00			
	3.08	9.60	12.68	12.85	101
	4.62	4.80	9.42	9.55	101
	5.39	2.40	7.79	8.00	102
	5.77	1.20	6.97	7.29	104
C	11.71	0.00			
	5.85	9.60	15.45	15.85	102
	8.78	4.80	13.58	18.77	101
	10.24	2.40	12.64	12.61	99
	10.98	1.20	12.18	13.30	109
D	8.43	0.00			
	4.21	9.60	13.81	15.14	109
	6.32	4.80	11.12	11.34	102
	7.37	2.40	9.77	10.34	105
	7.90	1.20	9.10	9.27	101

#### 14.1.2 Linealidad y Paralelismo

Se hicieron diluciones seriadas, con tampón fosfato salino, de cuatro muestras de orina y de dos controles de orina comerciales Lyphochek 1 y 2 (Bio-Rad).

Se calculó la razón (B/Bo) (absorbancia de cada dilución (B), absorbancia de 0 µg/ml Calibrador (Bo)) y se representó en papel log-logit.

#### 14.2 Precisión

##### 14.2.1 Intraensayo

Se evaluó el coeficiente de variación intraensayo en tres muestras de orina a diferentes concentraciones de VMA.

Intraensayo	Muestra A	Muestra B	Muestra C
<b>N</b>	26	24	24
<b>Media (µg/ml)</b>	0.96	8.25	11.24
<b>S.D. (µg/ml)</b>	0.06	0.52	0.71
<b>C.V. (%)</b>	6.0	6.3	6.0

##### 14.2.2 Interensayo

Se evaluó el coeficiente de variación interensayo a tres concentraciones diferentes, mediante el análisis de muestras en 16 a 19 ocasiones diferentes.

Interensayo	VNA 1	VMA 2	VMA 3
<b>N</b>	16	19	19
<b>Media (µg/ml)</b>	1.193	2.821	9.698
<b>S.D (µg/ml)</b>	0.086	0.232	0.686
<b>C.V. (%)</b>	5.7	8.2	7.1

#### 14.3 Especificidad

Se probaron las siguientes sustancias para reactividad cruzada del ensayo. La reactividad cruzada se expresa en términos de porcentaje de la concentración de cada sustancia que produce un desplazamiento del 50%.

---

Sustancia	Reactividad Cruzada (%)	
	VMA	
Ácido Vanililmandélico	100	
Ácido Homovanílico	<0.01	
Ácido DL-3,4-Dihidroxi-3-indolacético	4	
Ácido 3,4-Dihidroxi-3-indolacético	<0.01	
Metanefrina	<0.01	
Ácido Vanililpirúvico	4	
Ácido Vanílico	<0.01	
Dopamina	<0.01	
Ácido 5-Hidroxi-3-indolacético	<0.01	
Ácido Vanililáctico	<0.01	
Glicol 3-metoxi-4-hidroxifenilo	<0.01	

#### 14.4 Sensibilidad

La sensibilidad de este ensayo es mayor de 0.0625 µg/ml. Se ha estimado que la concentración mínima detectable de VMA es 0.035 µg/ml. La concentración mínima detectable se define como la concentración de VMA que corresponde a la absorbancia que es dos desviaciones estándar de la media de absorbancia de 20 determinaciones a dosis cero de VMA.

#### 14.5 Estabilidad de la Muestra

Se estudió la estabilidad de la muestra en dos muestras de orina diferentes a 4°C y -20°C hasta 5 días y 50 días, respectivamente. Los resultados confirman que la VMA es estable almacenada a 4°C al menos en los 5 días ensayados, y hasta 50 días cuando se almacena a -20°C.








**15 REFERENCES /LITERATUR / REFERENCIAS**

1. Pisano, J.J., Crout, J.R. and Abraham, D.: Determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine. *Clin.Chim. Acta* 7: 285-291, 1962.
2. Vahidi, H.R., Roberts, J.S., San Filippo, J., Jr. and Sankar, D.V.: Paper chromatographic quantitation of 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid (VMA) in urine. *Clin. Chem.* 17: 903, 1971.
3. Gitlow, S.E., Mendlowitz, M. and Bertain, L.: The biochemical techniques for detecting and establishing the presence of pheochromocytoma. *Am. J. Cardiol.* 26: 270, 1970.
4. Badelly, M., Routh, M.W., Gump, B.H. and Gigliotti, H.J.: Thin-layer chromatographic method for urinary 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid (vanilmandelic acid). In Gooper, G.R., editor: *Selected methods in clinical chemistry*, Washington, D.C., 1977. American Association for Clinical Chemistry, pp. 139-145.
5. Yoshida, A., Yoshioka, M., Tanimura, T. and Tamura, Z.: Determination of vanilmandelic acid and homovanillic acid in urine by high speed liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 116: 240, 1976.
6. Felice, L.J. and Kissinger, P.R.: A modification of the Pisano method for vanilmandelic acid using high pressure liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta* 76: 317, 1977.
7. Bertani-Dziedzic, L., Krstulovic, A.M., Ciriello, S. and Gitlow, S.E.: Routine reverse-phase high performance liquid chromatographic measurement of urinary vanillylmandelic acid in patients with neural crest tumors. *J. Chromatogr.* 164:345, 1979.
8. Soldin, S.J. and Hill, J.G.: Simultaneous liquid chromatographic analysis for 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid and 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid in urine. *Clin. Chem.* 26: 291, 1980.
9. Soldin, S.J. and Hill, J.G.: Liquid chromatographic analysis for urinary 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid and its use in investigation of neural crest tumors. *Clin. Chem.* 27: 502, 1981.
10. Moleman, P. and Borstok, J.J. M.: Determination of urinary vanillylmandelic acid by liquid chromatography with electro-chemical detection. *Clin.Chem.* 29: 878, 1983.
11. Fujita, K., Maruta, K., Ito S. and Nagatsu, T.: Urinary 4-hydroxy-3-methoxymandelic (vanillylmandelic) acid, 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic (homovanillic) acid, and 5-hydroxy-3-indoleacetic acid determined by liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin. Chem.* 29: 876, 1983.
12. Rosano, T.G. and Brown, H.H.: Liquid chromatographic assay for urinary 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid as measured by liquid chromatography, with on-line
13. Flood, J.G., Granger, M. and McComb, R.B.: Urinary 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid as measured by liquid chromatography, with on-line post-column reaction. *Clin. Chem.* 25: 1234, 1979.
14. Manger, W.M. and Gifford, R.W., Jr.: *PHEOCHROMOCYTOMA* p.202, Springer-Verlag, N.Y., 1977.
15. Forman, D.T., Grayson, S.H. and Kirkpatrick, K.: Rapid determination of Vanilmandelic acid in urine by ion-exchange chromatography. *Clin. Chem.* 19:646, 1973.
16. Forman, D.T.: Measurement of Vanillylmandelic acid (VMA) by Column chromatography. *Clinical Pathology of Cancer of the Endocrine Glands and Target Organs*. Sunder, F.W., ed. Philadelphia, Institute for Clinical Sciences, Inc., p. 167, 1978.
17. Caraway, W.T. and Kammeyer, C.W.: Chemical interference by drugs and other substances with clinical laboratory test procedures. *Clin. Chim. Acta* 41:395, 1972.



## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAY'S

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso 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.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	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
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Consulte as instruções de utilização	Se brugsanvisning	Se bruksanvisningen	Εγχειρίδιο χρήστη
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
				
	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevarings-temperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
Distributed by				
Content	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
Volume/No.	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..