Instructions for Use

Tri Cat ELISA

IVD

CE

REF EIA-4080

Σ 96

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

(2022-08-30)

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1 INTRODUCTION 2
2 PROCEDURAL CAUTIONS, GUIDELINES, WARNINGS AND LIMITATIONS 2
3 STORAGE AND STABILITY 3
4 MATERIALS 4
5 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE 6
6 TEST PROCEDURE 6
7 CALCULATION OF RESULTS 9
8 ASSAY CHARACTERISTICS 10
9 REFERENCES/LITERATURE 11

1 EINLEITUNG 12
2 VERFAHRENSHINWEISE, RICHTLINIEN, WARNUNGEN UND ANWENDUNGSGRENZEN 12
3 LAGERUNG UND HALTBARKEIT 13
4 MATERIALIEN 14
5 PROBENMATERIAL UND LAGERUNG 16
6 TESTDURCHFÜHRUNG 16
7 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE 19
8 TESTCHARAKTERISTIKA 20
9 REFERENZEN/LITERATUR 21

SYMBOLS USED 22

1 INTRODUCTION

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of adrenaline (epinephrine), noradrenaline (norepinephrine) and dopamine in plasma and urine.

Adrenaline (epinephrine), noradrenaline (norepinephrine), and dopamine are extracted by using a cis-diol-specific affinity gel, acylated and then converted enzymatically.

The competitive ELISA kit uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The derivatized standards, controls and samples and the solid phase bound analytes compete 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. The reaction is monitored at 450 nm.

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

1.2 Clinical application

In humans the catecholamines adrenaline (epinephrine), noradrenaline (norepinephrine) and dopamine are neurotransmitters of the sympathetic nervous system and are involved in many physiological processes. The sympathetic nervous system sets the body to a heightened state of alert, also called as the body's fight-or-flight response.

In the human body the catecholamines and their metabolites indicate the adaption of the body to acute and chronic stress.

Next to the metanephrine/normetanephrine the catecholamines are important for the diagnosis and the follow-up of tumors of the sympathoadrenal system like the pheochromocytomas. The quantitative determination of catecholamines in urine is preferred for the diagnosis of these tumors, whereas the determination of catecholamines in plasma is medically sensible for the localization of the tumor and for function testing. Values above the cut-off can provide an indication for neuroendocrine tumors.

However, in literature various diseases like hypertension, cardiovascular diseases, schizophrenia and manic depression are described with abnormal low or high levels of catecholamines.

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as under point "Procedural cautions, guidelines and warnings". 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.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any 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 has to 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 certain types of samples 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) have to be followed.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water.
7. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 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 to be able to identify potential pipetting errors.
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 ready 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 H_2SO_4. 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. Wash contaminated objects before reusing them.
17. For information on 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. The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
19. The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence (e.g. medication before a scheduled surgery)but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
20. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed according to national regulations.
21. 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.

2.2 Limitations

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

2.2.1 Interfering substances

Plasma

Samples containing precipitates or fibrin strands or which are haemolytic or lipemic might cause inaccurate results. Hemolytic samples (up to 4 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 50 mg/dL bilirubin) and lipemic samples (up to 800 mg/dL triglycerides) have no influence on the assay results.

If the concentrations cannot be estimated and there are doubts as to whether the above limit values for hemolytic, icteric or lipemic samples are complied with, the samples should not be used in the assay.

24-hour urine

Please note the sample preparation! 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 interferences

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

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3 STORAGE AND STABILITY

Store the unopened reagents at 2 °C - 8 °C until expiration date.

Do not use components beyond the expiry date indicated on the kit labels.

Once opened the reagents are stable for 2 months when stored at 2 °C - 8 °C.

Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly with desiccant again.

4 MATERIALS

4.1 Content of the kit

FOILS **Adhesive Foil** - Ready to use

Content: Adhesive Foils in a resealable pouch
Volume: 3 x 4 foils

WASH-CONC 50x **Wash Buffer Concentrate -** Concentrated 50x

Content: Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH
Volume: 3 x 20 mL/vial, light purple cap

CONJUGATE **Enzyme Conjugate** - Ready to use

Content: Goat anti-rabbit immunoglobulins, conjugated with peroxidase
Volume: 3 x 12 mL/vial, red cap

SUBSTRATE **Substrate** - Ready to use

Content: Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide
Volume: 3 x 12 mL/vial, black cap

STOP-SOLN **Stop Solution** - Ready to use

Content: 0.25 M sulfuric acid
Volume: 3 x 12 mL/vial, light grey cap
Hazards identification:
H290 May be corrosive to metals.

ADR MN **Adrenaline Microtiter Strips**- Ready to use

Content: 1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable blue pouch with desiccant

NAD NMN **Noradrenaline Microtiter Strips**- Ready to use

Content: 1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable yellow pouch with desiccant

DOP **Dopamine Microtiter Strips**- Ready to use

Content: 1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable green pouch with desiccant

ADR-AS **Adrenaline Antiserum** - Ready to use

Content: Rabbit anti-adrenaline antibody, blue coloured
Volume: 1 x 6 mL/vial, blue cap

NAD-AS **Noradrenaline Antiserum** - Ready to use

Content: Rabbit anti-noradrenaline antibody, yellow coloured
Volume: 1 x 6 mL/vial, yellow cap

DOP-AS **Dopamine Antiserum** - Ready to use

Content: Rabbit anti-dopamine antibody, green coloured
Volume: 1 x 6 mL/vial, dark green cap

ACYL-REAG **Acylation Reagent** - Ready to use

Content: Acylation reagent in DMSO
Volume: 1 x 3 mL/vial, white cap

ADJUST-BUFF **Adjustment Buffer** - Ready to use

Content: TRIS buffer
Volume: 2 x 4 mL/vial, green cap

ACYL-BUFF **Acylation Buffer** - Ready to use

Content: Buffer with light alkaline pH for the acylation
Volume: 1 x 20 mL/vial, white cap

ASSAY-BUFF **Assay Buffer** - Ready to use

Content: 1M hydrochloric acid and a non-mercury preservative
Volume: 1 x 6 mL/vial, light grey cap

COENZYME **Coenzyme** - Ready to use

Content: S-adenosyl-L-methionine
Volume: 1 x 4 mL/vial, purple cap

ENZYME **Enzyme** - Lyophilized

Content: Catechol-O-methyltransferase
Volume: 6 vials, pink cap

EXTRACT-BUFF **Extraction Buffer** - Ready to use

Content: Buffer containing carbonate
Volume: 1 x 6 mL/vial, brown cap

EXTRACT-PLATE 48 **Extraction Plate** - Ready to use

Content: 2 x 48 well plates coated with boronate affinity gel in a resealable pouch

HCL **Hydrochloric Acid** - Ready to use

Content: 0.025 M Hydrochloric Acid, yellow coloured
Volume: 1 x 20 mL/vial, dark green cap

Standards and **Controls** - Ready to use

Component	Colour/ Cap	Concentration ng/mL			Concentration nmol/L			Volume/ Vial
		ADR	NAD	DOP	ADR	NAD	DOP	
STANDARD A	white	0	0	0	0	0	0	4 mL
STANDARD B	light yellow	1	5	10	5.5	30	65	4 mL
STANDARD C	orange	4	20	40	22	118	261	4 mL
STANDARD D	dark blue	15	75	150	82	443	980	4 mL
STANDARD E	light grey	50	250	500	273	1478	3265	4 mL
STANDARD F	black	200	1000	2000	1092	5910	13060	4 mL
STANDARD A/B	light purple	-	-	4.5	-	-	29	4 mL
CONTROL 1	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!						4 mL
CONTROL 2	dark red							4 mL

Conversion: Adrenaline (ng/mL) x 5.46 = Adrenaline (nmol/L)
Noradrenaline (ng/mL) x 5.91 = Noradrenaline (nmol/L)
Dopamine (ng/mL) x 6.53 = Dopamine (nmol/L)

Content: Acidic buffer with non-mercury stabilizer, spiked with defined quantity of adrenaline, noradrenaline, and dopamine

⚠ **for the determination of dopamine in plasma the additional **Standard A/B** is mandatory!*

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

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 – 700 µL; 1 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
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Vortex mixer

5 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Plasma

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing EDTA as anti-coagulant and centrifuged according to manufacturer's instructions immediately after collection.

In case of hemolytic, icteric or lipemic samples see 2.2.1.

Storage: up to 6 hours at 2 °C - 8 °C,
for longer period (up to 6 months) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

Urine

Spontaneous urine or 24-hour urine, collected in a bottle containing 10 - 15 mL of 6 M HCl, can be used.

If 24-hour urine is used please record the total volume of the collected urine.

Storage: up to 48 hours at 2 °C - 8 °C,
up to 24 hours at room temperature,
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 to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Duplicate determinations are recommended.

It is recommended to number the strips of the microwell plate before usage to avoid any mix-up.

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 °C - 25 °C.

6.1 Preparation of reagents

Wash Buffer

Dilute the 20 mL Wash Buffer Concentrate with water (deionized, distilled, or ultra-pure) to a final volume of 1000 mL.

Storage: 2 months at 2 °C - 8 °C

Enzyme Solution

Reconstitute the content of the vial labelled 'Enzyme' with 1 mL water (deionized, distilled, or ultra-pure) and mix thoroughly. Add 0.3 mL of Coenzyme followed by 0.7 mL of Adjustment Buffer.

The total volume of the Enzyme Solution is 2.0 mL.

⚠ *The Enzyme Solution has to be prepared freshly prior to the assay (not longer than 10 - 15 minutes in advance). Discard after use!*

Adrenaline Microtiter Strips, Noradrenaline Microtiter Strips and Dopamine 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.

Acylation Reagent

The Acylation Reagent has a freezing point of 18.5 °C. To ensure that the Acylation Reagent is liquid when being used, it must be ensured that the Acylation Reagent has reached room temperature and forms a homogeneous, crystal-free solution before being used.

6.2 Sample preparation, extraction and acylation

⚠ **for the determination of dopamine in plasma the additional **Standard A/B** is mandatory!*

1. Pipette **10 µL** of **standards**, **controls**, **urine samples** and **300 µL** of **plasma samples** into the respective wells of the **Extraction Plate**.
2. Add **250 µL** of **water** (deionized, distilled, or ultra-pure) to the wells with **standards, controls** and **urine samples.**
3. Pipette **50 µL** of **Assay Buffer** into all wells.
4. Pipette **50 µL** of **Extraction Buffer** into all wells.
5. Cover plate with **Adhesive Foil** and incubate **30 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
6. Remove the foil. Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
7. Pipette **1 mL** of **Wash Buffer** into all wells. Incubate the plate for **5 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm). Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
8. Pipette another **1 mL** of **Wash Buffer** into all wells. Incubate the plate for **5 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm). Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
9. Pipette **150 µL** of **Acylation Buffer** into all wells.
10. Pipette **25 µL** of **Acylation Reagent** into all wells.
11. Incubate **15 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
12. Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
13. Pipette **1 mL** of **Wash Buffer** into all wells. Incubate the plate for **10 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm). Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
14. Pipette **175 µL** of **Hydrochloric Acid** into all wells.
15. Cover plate with **Adhesive Foil**. Incubate **10 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).

⚠ Remove the foil and discard.

Do not decant the supernatant thereafter!

The following volumes of the supernatant are needed for the subsequent ELISA:

Adrenaline	**100 µL**	**Noradrenaline**	**20 µL**
Dopamine (standards + urine)	**25 µL**	**Dopamine (plasma)**	**50 µL**

6.3 Adrenaline ELISA

1. Pipette **25 µL** of the **Enzyme Solution** (refer to 6.1*)* into all wells of the **Adrenaline Microtiter Strips**.
2. Pipette **100 µL** of the extracted **standards, controls and samples** into the appropriate wells.
3. Incubate for **30 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
4. Pipette **50 µL** of the respective **Adrenaline Antiserum** into all wells and cover plate with **Adhesive Foil**.
5. Incubate for **2 h** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
6. Remove the foil. 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.
7. Pipette **100 µL** of the **Enzyme Conjugate** into all wells.
8. Incubate for **30 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
9. 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.
10. Pipette **100 µL** of the **Substrate** into all wells and incubate for **25 ± 5 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm). ⚠ ***Avoid exposure to direct sunlight!***
11. Add **100 µL** of the **Stop Solution** to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
12. **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).

6.4 Noradrenaline ELISA

1. Pipette **25 µL** of the **Enzyme Solution** (refer to 6.1*)* into all wells of the **Noradrenaline Microtiter Strips**.
2. Pipette **20 µL** of the extracted **standards, controls and samples** into the appropriate wells.
3. Incubate for **30 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
4. Pipette **50 µL** of the **Noradrenaline Antiserum** into all wells and cover plate with **Adhesive Foil**.
5. Incubate for **2 h** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
6. Remove the foil. 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.
7. Pipette **100 µL** of the **Enzyme Conjugate** into all wells.
8. Incubate for **30 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
9. 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.
10. Pipette **100 µL** of the **Substrate** into all wells and incubate for **25 ± 5 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm). ⚠ ***Avoid exposure to direct sunlight!***
11. Add **100 µL** of the **Stop Solution** to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
12. **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).

6.5 Dopamine ELISA

1. Pipette **25 µL** of the **Enzyme Solution** (refer to 6.1*)* into all wells of the **Dopamine Microtiter Strips**.
2. Pipette **25 µL** of the extracted **standards, controls, urine samples** and **50 µL** of the extracted **plasma samples** into the appropriate wells.
3. Add **25 µL** of **Hydrochloric Acid** to the **standards, controls** and **urine samples.**
4. Incubate for **30 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
5. Pipette **50 µL** of the **Dopamine Antiserum** into all wells and cover plate with **Adhesive Foil**.
6. Incubate for **2 h** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
7. Remove the foil. 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 **Enzyme Conjugate** into all wells.
9. Incubate for **30 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
10. 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.
11. Pipette **100 µL** of the **Substrate** into all wells and incubate for **25 ± 5 min** at **RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm). ⚠ ***Avoid exposure to direct sunlight!***
12. Add **100 µL** of the **Stop Solution** to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
13. **Read** the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to **450 nm** (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

7 CALCULATION OF RESULTS

		Adrenaline	Noradrenaline	Dopamine
Measuring range	Urine	0.7 - 200 ng/mL	2.5 - 1 000 ng/mL	4.8 - 2 000 ng/mL
	Plasma	18 – 6 667 pg/mL	93 – 33 333 pg/mL	75 – 33 333 pg/mL

The standard curves are obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis).
Use a non-linear regression for curve fitting (e. g. 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.

Urine samples and controls
The concentrations of the **urine samples** and the **Controls** can be read directly from the standard curve.
Calculate the 24 h excretion for each urine sample: **µg/24 h = µg/L x L/24 h**

Plasma samples
The read **Adrenaline and Noradrenaline** concentrations of the **plasma samples** have to be **divided by 30.**
The read **Dopamine** concentrations of the **plasma samples** have to be **divided by 60.**

Conversion Adrenaline (ng/mL) x 5.46 = Adrenaline (nmol/L)
Noradrenaline (ng/mL) x 5.91 = Noradrenaline (nmol/L)
Dopamine (ng/mL) x 6.53 = Dopamine (nmol/L)

Expected reference values
It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

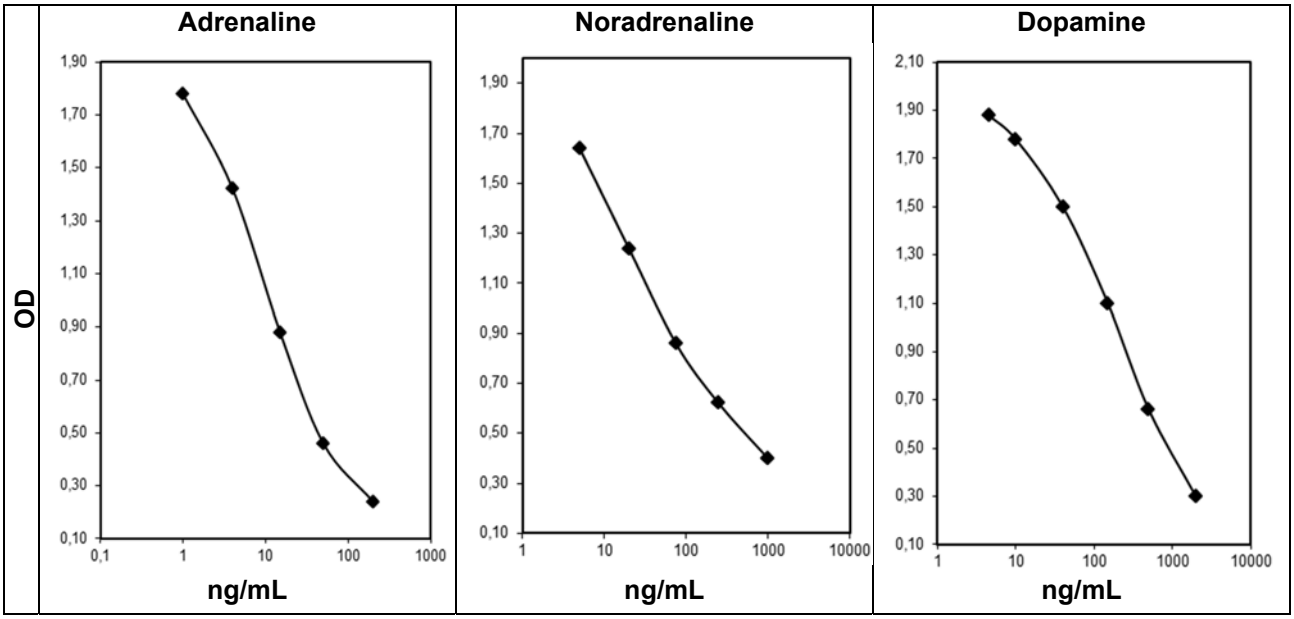
	Adrenaline	Noradrenaline	Dopamine
24-hour urine	< 20 µg/day (110 nmol/day)	< 90 µg/day (535 nmol/day)	< 600 µg/day (3 900 nmol/day)
Plasma	< 100 pg/mL	< 600 pg/mL	< 100 pg/mL

7.1 Quality control

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

7.2 Typical standard curves

⚠ *Examples, do not use for calculation!*



8 ASSAY CHARACTERISTICS

			Adrenaline	Noradrenaline	Dopamine
Analytical Sensitivity	**LOD**	Urine (ng/mL)	0.9	1.7	2.5
		Plasma (pg/mL)	10	36	49
	LOQ	Urine (ng/mL)	0.7	2.5	4.8
		Plasma (pg/mL)	18	93	75

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	**Substance**	**Cross Reactivity (%)**		
		Adrenaline	Noradrenaline	Dopamine
	Derivatized Adrenaline	100	0.08	0.02
	Derivatized Noradrenaline	0.13	100	6.4
	Derivatized Dopamine	< 0.01	0.03	100
	Metanephrine	0.18	< 0.01	< 0.01
	Normetanephrine	< 0.01	0.16	0.01
	3-Methoxytyramine	< 0.01	< 0.01	0.49
	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	Tyramine	< 0.01	< 0.01	0.18
	Phenylalanine, Caffeinic acid, L-Dopa, Homovanillic acid, Tyrosine, 3-Methoxy-4-hydroxymandelic acid	< 0.01	< 0.01	< 0.01

Precision							
Intra-Assay Urine (n = 60)				**Intra-Assay Plasma (n = 60)**			
	Sample	**Range (ng/mL)**	**CV (%)**		**Sample**	**Range (pg/mL)**	**CV (%)**
Adrenaline	1	6.2 ± 1.1	17.4	Adrenaline	1	64.7 ± 15.9	24.7
	2	21.4 ± 2.7	12.4		2	258 ± 32.5	12.7
	3	59.4 ± 7.8	13.1		3	948 ± 105	11.0
Noradrenaline	1	26.1 ± 3.6	13.8	Noradrenaline	1	510 ± 65	12.8
	2	97 ± 12.8	13.4		2	1 358 ± 194	14.3
	3	267 ± 35	13.1		3	3 363 ± 374	11.1
Dopamine	1	82 ± 16.1	19.7	Dopamine	1	75 ± 22	29.8
	2	253 ± 41.1	16.3		2	353 ± 86	24.4
	3	714 ± 67	9.4		3	1 187 ± 293	24.9
Inter-Assay Urine (n = 33)				**Inter-Assay Plasma (n = 18)**			
	Sample	**Range (ng/mL)**	**CV (%)**		**Sample**	**Range (pg/mL)**	**CV (%)**
Adrenaline	1	5.2 ± 0.9	17.9	Adrenaline	1	76.4 ± 11.1	14.5
	2	17.8 ± 2.1	11.7		2	247 ± 27.5	11.1
	3	54.2 ± 6.6	12.1		3	771 ± 101	13.1
Noradrenaline	1	19.5 ± 3.9	20.0	Noradrenaline	1	445 ± 40.9	9.2
	2	80.6 ± 10.6	13.2		2	1 232 ± 134	10.9
	3	226 ± 39.5	17.4		3	3 283 ± 302	9.2
Dopamine	1	79.3 ± 18.8	23.7	Dopamine	1	238 ± 67.0	28.2
	2	222 ± 27.0	12.1		2	1 072 ± 201	18.8
	3	630 ± 69.0	11.0		3	3 449 ± 491	14.2

			Serial dilution up to	Range (%)	Mean (%)
Linearity	Adrenaline	Urine	1:512	92 - 123	108
		Plasma	1:512	94 - 115	105
	Noradrenaline	Urine	1:512	100 - 127	112
		Plasma	1:512	102 - 125	112
	Dopamine	Urine	1:512	83 - 126	104
		Plasma	1:512	85 - 132	106

			Mean (%)	Range (%)	Range
Recovery	Adrenaline	Urine	106	94 - 120	4.5 - 53.5 ng/mL
		Plasma	105	88 - 117	9.1 - 4 268 pg/mL
	Noradrenaline	Urine	103	91 - 113	58.6 - 260 ng/mL
		Plasma	87	75 - 107	51 - 14 251 pg/mL
	Dopamine	Urine	110	101 - 124	225 - 1 306 ng/mL
		Plasma	89	84 - 92	57.4 - 1 6054 pg/mL

9 REFERENCES/LITERATURE

1. Dai et al. Association of plasma epinephrine level with insulin sensitivity in metabolically healthy but obese individuals. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, 167:66-69 (2012)
2. Gruber et al. Increased Dopamine Is Associated With the cGMP and Homocysteine Pathway in Female Migraineurs. Headache 50:109-116 (2010)
3. Mobine et al. Pheochromocytoma-Induced Cardiomyopathy is Modulated by the Synergistic Effects of Cell-Secreted Factors. Circulation: Heart Failure, 2(1):121-128 (2009)

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

1 EINLEITUNG

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Adrenalin (Epinephrin), Noradrenalin (Norepinephrin) und Dopamin in Plasma und Urin.

Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin werden mittels eines cis-diolspezifischen Boronat-Affinitätsgels aus der Probe extrahiert, danach azyliert und anschließend enzymatisch umgewandelt. Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist als feste Phase an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Die derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben und die an die Festphase gebundenen Antigene konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die ungebundenen Antigene und Antigen-Antikörper-Komplexe durch Waschen entfernt. Der an die Festphase gebundene Antikörper wird durch einen mit Peroxidase konjugierten Antikörper erkannt und anschließend mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen.

Die Konzentrationen der unbekannten Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve und Abgleich der gemessenen Absorption ermittelt.

1.2 Klinische Anwendung

Die Katecholamine Adrenalin (Epinephrin), Noradrenalin (Norepinephrin) und Dopamin sind Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems und bewirken zahlreiche physiologische Prozesse im Menschen. Der Sympathikus versetzt den Körper in eine erhöhte Alarmbereitschaft. Folglich ist über die sekretierte Menge der Katecholamine und deren Abbauprodukte im Menschen die Adaption des Körpers an akuten und chronischen Stress bestimmbar.

In der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von Tumoren des sympathico-adrenalen Systems wie z.B. dem Phäochromozytom, spielen die Katecholamine neben den Metanephrinen/Normetanephrinen eine entscheidende Rolle. Während für die Diagnosestellung die quantitative Bestimmung der Urinausscheidung bevorzugt wird, ist bei klinischen Funktionstesten sowie zur Lokalisation eines Tumors die Katecholaminbestimmung im Plasma sinnvoll. Werte oberhalb der Normalbereiche können ein Hinweis auf neuroendokrine Tumore sein.

Des Weiteren werden in der Literatur noch zahlreiche Krankheitsbilder wie z.B. Hypertonie, degenerative Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, Schizophrenie und manische Depression mit erhöhten oder erniedrigten Sekretionslevel der Katecholamine beschrieben.

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.

Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein.

2 VERFAHRENSHINWEISE, RICHTLINIEN, WARNUNGEN UND ANWENDUNGSGRENZEN

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

1. Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung 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) angegebenen Probenarten 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. Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
5. Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
6. Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra pures Wasser verwenden.
7. Die Mikrotiterplatte verfügt über abbrechbare Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 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. Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.

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 Vertiefungen 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 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 H_2SO_4 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 Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
18. Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
19. Jegliche therapeutische Maßnahme (z.B. die Verabreichung von Medikamenten vor einer planmäßigen Operation) darf sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern muss im Zusammenhang mit anderen diagnostischen Untersuchungen und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.
20. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
21. 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.

2.2 Grenzen des Tests

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

2.2.1 Interferenzen

Plasma

Proben, die Präzipitate oder Fibrinfäden enthalten oder die hämolytisch oder lipämisch sind, können zu ungenauen Ergebnissen führen. Hämolytische Proben (bis zu 4 mg/mL Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 50 mg/dL Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 800 mg/dL Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse.

Sollten die Konzentrationen nicht abzuschätzen sein und Zweifel bestehen, ob die oben genannten Grenzwerte für hämolytische, ikterische oder lipämische Proben eingehalten werden, sollten die Proben nicht im Assay eingesetzt werden.

Sammelurin

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

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des Katecholamin-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

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2 °C - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufzubewahren.

Die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

Einmal geöffnet sind die Reagenzien 2 Monate stabil, wenn sie bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Der einmal geöffnete Beutel der Mikrotiterplatte sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4 MATERIALIEN

4.1 Reagenzien im Kit

FOILS **Adhesive Foil** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel
Volumen: 3 x 4 Folien

WASH-CONC 50x **Wash Buffer Concentrate -** 50x konzentriert

Inhalt: Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH
Volumen: 3 x 20 mL/Fläschchen, Deckel helllila

CONJUGATE **Enzyme Conjugate** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Ziege Anti-Kaninchen Immunoglobuline konjugiert mit Peroxidase
Volumen: 3 x 12 mL/ Fläschchen, Deckel rot

SUBSTRATE **Substrate** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Chromogenes Substrat mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid
Volumen: 3 x 12 mL/ Fläschchen, Deckel schwarz

STOP-SOLN **Stop Solution** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 0,25 M Schwefelsäure
Volumen: 3 x 12 mL/ Fläschchen, Deckel hellgrau

ADR MN **Adrenaline Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem blauen wiederverschließbaren Beutel

Mögliche Gefahren:
H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

NAD NMN **Noradrenaline Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem gelben wiederverschließbaren Beutel

DOP **Dopamine Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem grünen wiederverschließbaren Beutel

ADR-AS **Adrenaline Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Kaninchen Anti-Adrenalin Antikörper, blau gefärbt
Volumen: 1 x 6 mL/Fläschchen, Deckel blau

NAD-AS **Noradrenaline Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Kaninchen Anti-Noradrenalin Antikörper, gelb gefärbt
Volumen: 1 x 6 mL/Fläschchen, Deckel gelb

DOP-AS **Dopamine Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Kaninchen Anti-Dopamin Antikörper, grün gefärbt
Volumen: 1 x 6 mL/Fläschchen, Deckel dunkelgrün

ACYL-REAG **Acylation Reagent** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Azylierungsreagenz in DMSO
Volumen: 1 x 3 mL/ Fläschchen, Deckel weiß

ADJUST-BUFF **Adjustment Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: TRIS Puffer zur pH-Wert Einstellung
Volumen: 2 x 4 mL/ Fläschchen, Deckel grün

ACYL-BUFF **Acylation Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Leicht basischer Puffer zur Azylierung mit quecksilberfreien Stabilisatoren
Volumen: 1 x 20 mL/ Fläschchen, Deckel weiß

ASSAY-BUFF **Assay Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 1M Salzsäure mit quecksilberfreien Stabilisatoren
Volumen: 1 x 6 mL/Fläschchen, Deckel hellgrau

COENZYME **Coenzyme** - Gebrauchsfertig

Inhalt: S-adenosyl-L-methionine
Volumen: 1 x 4 mL/ Fläschchen, Deckel lila

ENZYME **Enzyme** - Lyophilisat

Inhalt: Catechol-O-methyltransferase
Volumen: 6 Fläschchen, Deckel hellrosa

EXTRACT-BUFF **Extraction Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Carbonatpuffer
Volumen: 1 x 6 mL/Fläschchen, Deckel braun

EXTRACT-PLATE 48 **Extraction Plate** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 2 x 48 Well Platte beschichtet mit Boronat Affinitätsgel in einem wiederverschließbaren Beutel

HCL **Hydrochloric Acid** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 0,025 M Salzsäure, gelb gefärbt
Volumen: 1 x 20 mL/ Fläschchen, Deckel dunkelgrün

Standards und **Controls** - Gebrauchsfertig

Komponente	Deckel-farbe	Konzentration ng/mL			Konzentration nmol/L			Volumen/ Fläschchen
		ADR	NAD	DOP	ADR	NAD	DOP	
STANDARD A	weiß	0	0	0	0	0	0	4 mL
STANDARD B	hellgelb	1	5	10	5,5	30	65	4 mL
STANDARD C	orange	4	20	40	22	118	261	4 mL
STANDARD D	dunkelblau	15	75	150	82	443	980	4 mL
STANDARD E	hellgrau	50	250	500	273	1 478	3 265	4 mL
STANDARD F	schwarz	200	1 000	2 000	1 092	5 910	13 060	4 mL
STANDARD A/B	helllila	-	-	4,5	-	-	29	4 mL
CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC Report angegeben.						4 mL
CONTROL 2	dunkelrot							4 mL

Umrechnung: Adrenalin (ng/mL) x 5,46 = Adrenalin (nmol/L)
Noradrenalin (ng/mL) x 5,91 = Noradrenalin (nmol/L)
Dopamin (ng/mL) x 6,53 = Dopamin (nmol/L)

Inhalt: Saurer Puffer mit quecksilberfreien Stabilisatoren, aufgestockt mit definierten Mengen Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin

⚠ **Zur Bestimmung des Dopamins im Plasma muss der zusätzliche **Standard A/B** verwendet werden!*

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 – 700 µL; 1 mL
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 - 650 nm-Filter
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Saugfähige Unterlage
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- Vortex-Mischer

5 PROBENMATERIAL UND LAGERUNG

Plasma

Das durch Venenpunktion entnommene Vollblut in einem für EDTA-Plasma vorgesehenen Blutentnahmeröhrchen sammeln und das EDTA-Plasma direkt durch Zentrifugation (nach Angaben des Herstellers) von den übrigen Blutbestandteilen trennen.

Lagerung: bis zu 6 Stunden bei 2 °C - 8 °C;
für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden.

Hämolytische und lipämische Plasmen sollten nicht eingesetzt werden.

Urin

Es kann Spontanurin- oder 24-Stunden-Sammelurin verwendet werden (im Sammelbehälter werden zur Stabilisierung des Sammelurins 10 - 15 mL 6 M HCl vorgelegt). Wird 24-Stunden-Sammelurin verwendet, ist es notwendig, das Volumen zu notieren.

Lagerung: bis zu 48 Stunden bei 2 °C - 8 °C,
bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur und
für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben, sowie direktes Sonnenlicht sind zu vermeiden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.

Um eventuelle Verwechslungen der Mikrotiterstreifen zu vermeiden, wird empfohlen, diese vor Verwendung zu nummerieren.

Die Reaktion 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 Enzymimmunoassay liegt zwischen 20 °C - 25 °C.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer

20 mL **WASH-CONC 50X** mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 1000 mL verdünnen.

Lagerung: 2 Monate bei 2 °C - 8 °C

Enzymlösung

Den Inhalt des Fläschchens **ENZYME** in 1 mL Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auflösen und gut mischen. Anschließend 0,3 mL **COENZYME** und 0,7 mL **ADJUST-BUFF** dazu pipettieren (Endvolumen 2,0 mL).

⚠ *Die Enzymlösung darf erst 10 - 15 Minuten vor Gebrauch angesetzt werden! Nach Gebrauch verwerfen!*

Adrenalin Microtiter Strips, Noradrenalin Microtiter Strips und Dopamin Microtiter Strips

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.

Azylierungsreagenz

Das **ACYL-REAG** hat einen Gefrierpunkt von 18,5 °C. Um sicher zu stellen, dass es bei Gebrauch flüssig ist, muss es vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden und danach eine homogene, kristallfreie Lösung bilden.

6.2 Probenvorbereitung, Extraktion und Azylierung

⚠ **Zur Bestimmung des Dopamins im Plasma muss der zusätzliche **Standard A/B** verwendet werden!*

1. Jeweils **10 µL Standards**, **Kontrollen**, **Urinproben** und **300 µL Plasmaproben** in die entsprechenden Kavitäten der **EXTRACT-PLATE 48** pipettieren.
2. **250 µL Wasser** (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) zu den **Standards, Kontrollen** und **Urinproben** hinzugeben.
3. Je **50 µL ASSAY-BUFF** in alle Kavitäten pipettieren.
4. Je **50 µL EXTRACT-BUFF** in alle Kavitäten pipettieren.
5. **EXTRACT-PLATE 48** mit **FOIL** abdecken und für **30 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) schütteln.
6. **FOIL** entfernen. Die **EXTRACT-PLATE 48** ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
7. **1 mL Waschpuffer** in alle Kavitäten pipettieren. **5 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren. Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8. Wieder **1 mL Waschpuffer** in alle Kavitäten pipettieren. **5 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren. Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
9. Je **150 µL ACYL-BUFF** in alle Kavitäten pipettieren
10. Je **25 µL ACYL-REAG** in alle Kavitäten pipettieren
11. **15 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
12. Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
13. **1 mL Waschpuffer** in alle Kavitäten pipettieren. **10 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren. Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
14. Je **175 µL HCL** in alle Kavitäten pipettieren.
15. **EXTRACT-PLATE 48** mit **FOIL** abdecken und für **10 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) schütteln.

⚠ ***Überstand anschließend <u>nicht</u> verwerfen bzw. Platte nicht ausleeren!***

Von den Extrakten werden für den nachfolgenden ELISA folgende Volumina benötigt:

Adrenalin	**100 µL**	**Noradrenalin**	**20 µL**
Dopamin (Standards + Urin)	**25 µL**	**Dopamin (Plasma)**	**50 µL**

6.3 Adrenalin ELISA

1. Jeweils **25 µL Enzymlösung** (siehe 6.1*)* in die entsprechenden Kavitäten der **Ш ADR MN** pipettieren.
2. Je **100 µL** der extrahierten **Standards**, **Kontrollen** und **Proben** in die Kavitäten pipettieren.
3. Für **30 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
4. Jeweils **50 µL** des entsprechenden **ADR-AS** hinzugeben und Platte mit **FOIL** abdecken.
5. **2 Stunden** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
6. **FOIL** entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten **3-mal** gründlich mit **300 µL Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
7. **100 µL CONJUGATE** in alle Kavitäten pipettieren.
8. Für **30 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
9. Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten **3-mal** gründlich mit **300 µL Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
10. **100 µL SUBSTRATE** in alle Kavitäten pipettieren und für **25 ± 5 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren. ***Direktes Sonnenlicht vermeiden!***
11. **100 µL STOP-SOLN** in alle Kavitäten pipettieren und die Miktrotiterplatte kurz schütteln.
12. **Absorption** mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei **450 nm** (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620-650 nm) innerhalb von 10 Minuten **messen.**

6.4 Noradrenalin ELISA

1. Jeweils **25 µL Enzymlösung** (siehe 6.1*)* in die entsprechenden Kavitäten der **Ш NAD NMN** pipettieren.
2. Je **20 µL** der extrahierten **Standards**, **Kontrollen** und **Proben** in die Kavitäten pipettieren.
3. Für **30 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
4. Jeweils **50 µL** des entsprechenden **NAD-AS** hinzugeben und Platte mit **FOIL** abdecken.
5. **2 Stunden** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
6. **FOIL** entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten **3-mal** gründlich mit **300 µL Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
7. **100 µL CONJUGATE** in alle Kavitäten pipettieren.
8. Für **30 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
9. Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten **3-mal** gründlich mit **300 µL Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
10. **100 µL SUBSTRATE** in alle Kavitäten pipettieren und für **25 ± 5 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren. ***Direktes Sonnenlicht vermeiden!***
11. **100 µL STOP-SOLN** in alle Kavitäten pipettieren und die Miktrotiterplatte kurz schütteln.
12. **Absorption** mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei **450 nm** (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620-650 nm) innerhalb von 10 Minuten **messen.**

6.5 Dopamin ELISA

⚠ **Zur Bestimmung des Dopamins im Plasma muss der zusätzliche **Standard A/B** verwendet werden!*

1. Jeweils **25 µL Enzymlösung** (siehe 6.1*)* in die entsprechenden Kavitäten der **Ш DOP** pipettieren.
2. Je **25 µL** der extrahierten **Standards**, **Kontrollen** und **Urinproben** und **50 µL** der extrahierten **Plasmaproben** in die Kavitäten pipettieren.
3. Je **25 µL HCL** zu den extrahierten **Standards**, **Kontrollen** und **Urinproben** hinzugeben.
4. Für **30 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
5. Jeweils **50 µL** des entsprechenden **DOP-AS** hinzugeben und Platte mit **FOIL** abdecken.
6. **2 Stunden** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
7. **FOIL** entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten **3-mal** gründlich mit **300 µL Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8. **100 µL CONJUGATE** in alle Kavitäten pipettieren.
9. Für **30 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
10. Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten **3-mal** gründlich mit **300 µL Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
11. **100 µL SUBSTRATE** in alle Kavitäten pipettieren und für **25 ± 5 Min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren. ***Direktes Sonnenlicht vermeiden!***
12. **100 µL STOP-SOLN** in alle Kavitäten pipettieren und die Miktrotiterplatte kurz schütteln.
13. **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

		Adrenalin	Noradrenalin	Dopamin
Messbereich	Urin	0,7 - 200 ng/mL	2,5 - 1 000 ng/mL	4,8 - 2 000 ng/mL
	Plasma	18 – 6 667 pg/mL	93 - 33 333 pg/mL	75 - 33 333 pg/mL

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannten Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Absorptionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) 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.

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

Berechnung der 24 Stunden Urinproben: **µg/24 h = µg/L x L/24 h**

Plasmaproben
Die aus der Kurve abgelesenen **Adrenalin- und Noradrenalinkonzentrationen** müssen durch **30 dividiert** werden.
Die aus der Kurve abgelesenen **Dopaminkonzentrationen** müssen durch **60 dividiert** werden.

Umrechnung Adrenalin (ng/mL) x 5.46 = Adrenalin (nmol/L)
Noradrenalin (ng/mL) x 5.91 = Noradrenalin (nmol/L)
Dopamin (ng/mL) x 6.53 = Dopamin (nmol/L)

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

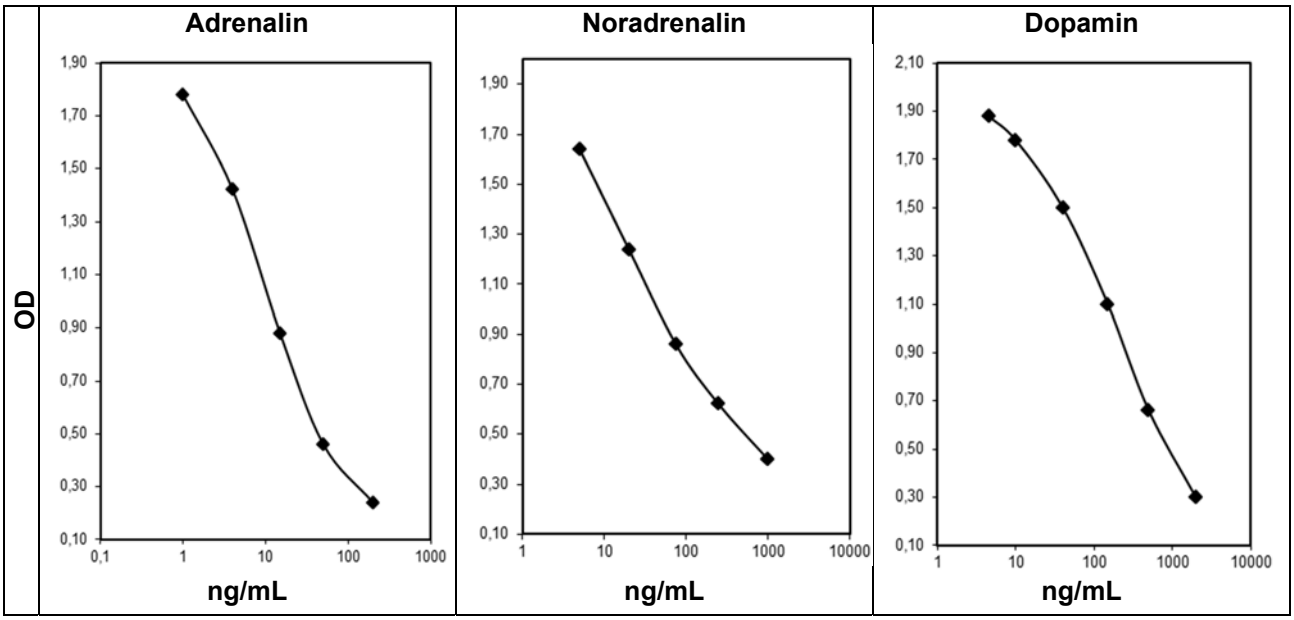
	Adrenalin	Noradrenalin	Dopamin
Sammelurin	< 20 µg/Tag (110 nmol/Tag)	< 90 µg/Tag (535 nmol/Tag)	< 600 µg/Tag (3 900 nmol/Tag)
Plasma	< 100 pg/mL	< 600 pg/mL	< 100 pg/mL

7.1 Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie die Kitkontrollen und/oder andere kommerzielle Kontrollproben im normalen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Die Kontrollproben müssen dabei innerhalb der angegebenen Bereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

7.2 Typische Standardkurven

⚠ *Beispiele: bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



8 TESTCHARAKTERISTIKA

			Adrenalin	Noradrenalin	Dopamin
Analytische Sensitivität	**LOD**	Urin (ng/mL)	0,9	1,7	2,5
		Plasma (pg/mL)	10	36	49
	LOQ	Urin (ng/mL)	0,7	2,5	4,8
		Plasma (pg/mL)	18	93	75

	Substanz	**Kreuzreaktion (%)**		
		Adrenalin	Noradrenalin	Dopamin
Analytische Spezifität (Kreuzreaktion)	Derivatisiertes Adrenalin	100	0,08	0,02
	Derivatisiertes Noradrenalin	0,13	100	6,4
	Derivatisiertes Dopamin	< 0,01	0,03	100
	Metanephrin	0,18	< 0,01	< 0,01
	Normetanephrin	< 0,01	0,16	0,01
	3-Methoxytyramin	< 0,01	< 0,01	0,49
	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	Tyramin	< 0,01	< 0,01	0,18
	Phenylalanin, Coffeinsäure, L-Dopa, Homovanillinsäure, Tyrosin, 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Präzision							
Intra-Assay Urin (n = 60)				**Intra-Assay Plasma (n = 60)**			
	Probe	**Bereich (ng/mL)**	**CV (%)**		**Probe**	**Bereich (pg/mL)**	**CV (%)**
Adrenalin	1	6,2 ± 1,1	17,4	Adrenalin	1	64,7 ± 15,9	24,7
	2	21,4 ± 2,7	12,4		2	258 ± 32,5	12,7
	3	59,4 ± 7,8	13,1		3	948 ± 105	11,0
Noradrenalin	1	26,1 ± 3,6	13,8	Noradrenalin	1	510 ± 65	12,8
	2	97 ± 12,8	13,4		2	1 358 ± 194	14,3
	3	267 ± 35	13,1		3	3 363 ± 374	11,1
Dopamin	1	82 ± 16,1	19,7	Dopamin	1	75 ± 22	29,8
	2	253 ± 41,1	16,3		2	353 ± 86	24,4
	3	714 ± 67	9,4		3	1 187 ± 293	24,9

Inter-Assay Urin (n = 33)				Inter-Assay Plasma (n = 18)			
	Probe	**Bereich (ng/mL)**	**CV (%)**		**Probe**	**Bereich (pg/mL)**	**CV (%)**
Adrenalin	1	5,2 ± 0,9	17,9	Adrenalin	1	76,4 ± 11,1	14,5
	2	17,8 ± 2,1	11,7		2	247 ± 27,5	11,1
	3	54,2 ± 6,6	12,1		3	771 ± 101	13,1
Noradrenalin	1	19,5 ± 3,9	20,0	Noradrenalin	1	445 ± 40,9	9,2
	2	80,6 ± 10,6	13,2		2	1 232 ± 134	10,9
	3	226 ± 39,5	17,4		3	3 283 ± 302	9,2
Dopamin	1	79,3 ± 18,8	23,7	Dopamin	1	238 ± 67,0	28,2
	2	222 ± 27,0	12,1		2	1 072 ± 201	18,8
	3	630 ± 69,0	11,0		3	3 449 ± 491	14,2

			Serielle Verdünnung bis	**Bereich (%)**	**Mittelwert (%)**
Linearität	Adrenalin	Urin	1:512	92 - 123	108
		Plasma	1:512	94 - 115	105
	Noradrenalin	Urin	1:512	100 - 127	112
		Plasma	1:512	102 - 125	112
	Dopamin	Urin	1:512	83 - 126	104
		Plasma	1:512	85 - 132	106

			Mittelwert (%)	**Bereich (%)**	**Bereich**
Wiederfindung	Adrenalin	Urin	106	94 - 120	4,5 – 53,5 ng/mL
		Plasma	105	88 - 117	9,1 – 4 268 pg/mL
	Noradrenalin	Urin	103	91 - 113	58,6 - 260 ng/mL
		Plasma	87	75 - 107	51 - 14 251 pg/mL
	Dopamin	Urin	110	101 - 124	225 - 1 306 ng/mL
		Plasma	89	84 - 92	57.4 - 1 6054 pg/mL

9 REFERENZEN/LITERATUR

1. Dai et al. Association of plasma epinephrine level with insulin sensitivity in metabolically healthy but obese individuals. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, 167:66-69 (2012)
2. Gruber et al. Increased Dopamine Is Associated With the cGMP and Homocysteine Pathway in Female Migraineurs. Headache 50:109-116 (2010)
3. Mobine et al. Pheochromocytoma-Induced Cardiomyopathy is Modulated by the Synergistic Effects of Cell-Secreted Factors. Circulation: Heart Failure, 2(1):121-128 (2009)

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

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
CE	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
IVD	*In vitro* diagnostic medical device *	*In-vitro*-Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Nûmero de catálogo	Référence de catalogue
LOT	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
Σ	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
Distributed by	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
Content	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité