



IMMUNOASSAYS AND SERVICES

BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Instructions for use
2-CAT ELISA **Fast Track**

REF

BA E-6500


2 x 96



IVD



1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

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

Adrenaline (epinephrine) and noradrenaline (norepinephrine) 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.
- (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 H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (16) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them.
- (17) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheet (MSDS). The Material 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.

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.

24-hour urine

Please note the *sample preparation and storage!* If the percentage of the final concentration of acid is too high, the buffer capacity of the Extraction Buffer is insufficient. As a consequence catecholamines will not be extracted adequately.

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 - 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 1 month when stored at 2 - 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

BA D-0090

FOILS

Adhesive Foil - Ready to use

Content: Adhesive Foils in a resealable pouch

Volume: 2 x 4 foils

BA E-0030

WASH-CONC 50x

Wash Buffer Concentrate - Concentrated 50x

Content: Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH

Volume: 2 x 20 ml/vial, light purple cap

BA E-0040

CONJUGATE

Enzyme Conjugate - Ready to use

Content: Goat anti-rabbit immunoglobulins, conjugated with peroxidase

Volume: 2 x 12 ml/vial, red cap

BA E-0055

SUBSTRATE

Substrate - Ready to use

Content: Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide

Volume: 2 x 12 ml/vial, black cap

- BA E-0080** STOP-SOLN **Stop Solution** - Ready to use
 Content: 0.25 M sulfuric acid
 Volume: 2 x 12 ml/vial, light grey cap
- BA E-0131** 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
- BA E-0231** 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
- BA E-6110** ADR-AS **Adrenaline Antiserum** - Ready to use
 Content: Rabbit anti-adrenaline antibody, blue coloured
 Volume: 1 x 6 ml/vial, blue cap
- BA E-6210** NAD-AS **Noradrenaline Antiserum** - Ready to use
 Content: Rabbit anti-noradrenaline antibody, yellow coloured
 Volume: 1 x 6 ml/vial, yellow cap
- BA R-0050** ADJUST-BUFF **Adjustment Buffer** - Ready to use
 Content: TRIS buffer
 Volume: 1 x 4 ml/vial, green cap

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/ Cap	Concentration ng/ml		Concentration nmol/l		Volume/ Vial
			ADR	NAD	ADR	NAD	
BA R-6601	STANDARD A	white	0	0	0	0	4 ml
BA R-6602	STANDARD B	light yellow	1	5	5.5	30	4 ml
BA R-6603	STANDARD C	orange	4	20	22	118	4 ml
BA R-6604	STANDARD D	dark blue	15	75	82	443	4 ml
BA R-6605	STANDARD E	light grey	50	250	273	1 478	4 ml
BA R-6606	STANDARD F	black	200	1 000	1 092	5 910	4 ml
BA R-6651	CONTROL 1	light green	Refer to QC report for expected value and acceptable range!				4 ml
BA R-6652	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)

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

- BA R-6611** ACYL-BUFF **Acylation Buffer** - Ready to use
 Content: Buffer with light alkaline pH for the acylation
 Volume: 1 x 20 ml/vial, white cap

- BA R-6612** ACYL-REAG **Acylation Reagent** - Ready to use
 Content: Acylation reagent in DMF and DMSO
 Volume: 1 x 3 ml/vial, light red cap

Hazards identification:



H225 Highly flammable liquid and vapour.
 H360 May damage fertility or the unborn child.
 H319 Causes serious eye irritation.

- BA R-6613** 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

BA R-6614	COENZYME	Coenzyme - Ready to use
Content:	S-adenosyl-L-methionine	
Volume:	1 x 4 ml/vial, purple cap	
BA R-6615	ENZYME	Enzyme - Lyophilized
Content:	Catechol-O-methyltransferase	
Volume:	4 vials, pink cap	
BA R-6617	EXTRACT-BUFF	Extraction Buffer - Ready to use
Content:	Buffer containing carbonate	
Volume:	1 x 6 ml/vial, brown cap	
BA R-6618	EXTRACT-PLATE 48	Extraction Plate - Ready to use
Content:	2 x 48 well plates coated with boronate affinity gel in a resealable pouch	
BA R-6619	HCL	Hydrochloric Acid - Ready to use
Content:	0.025 M Hydrochloric Acid, yellow coloured	
Volume:	1 x 20 ml/vial, dark green cap	

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 (Monovette™ or Vacuette™ for plasma) and centrifuged according to manufacturer's instructions immediately after collection.

Haemolytic and lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: up to 6 hours at 2 - 8 °C, for longer period (up to 6 month) 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 - 8 °C, up to 24 hours at room temperature, for longer periods (up to 6 month) 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.

The binding of the antisera and the enzyme conjugates and the activity of the enzyme used are temperature dependent, and the absorbance may vary if a thermostat is not used. The higher the temperature, the higher the absorbance will be. Varying incubation times will have a similar influence on the absorbance. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20 – 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: 1 month at 2 – 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!*

6.2 Sample preparation, extraction and acylation

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 – 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 – 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 – 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 – 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 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.				
14.	Pipette 150 µl of Hydrochloric Acid into all wells.				
15.	Cover plate with Adhesive Foil . Incubate 10 min at RT (20 – 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:				
	<table border="1"><tr><td>Adrenaline</td><td>100 µl</td><td>Noradrenaline</td><td>20 µl</td></tr></table>	Adrenaline	100 µl	Noradrenaline	20 µl
Adrenaline	100 µl	Noradrenaline	20 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 – 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 – 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 – 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 – 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 – 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 – 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 – 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 – 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).

7. Calculation of results

Measuring range		Adrenaline	Noradrenaline
	Urine		0.7 - 200 ng/ml
Plasma		18 - 6667 pg/ml	93 - 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. spline, 4- parameter, akima).



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: $\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$

Plasma samples

The read concentrations of the **plasma samples** have to be **divided by 30**.

Conversion

Adrenaline (ng/ml) \times 5.46 = Adrenaline (nmol/l)

Noradrenaline (ng/ml) \times 5.91 = Noradrenaline (nmol/l)

Expected reference values

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

	Adrenaline	Noradrenaline
24-hour urine	< 20 $\mu\text{g}/\text{day}$ (110 nmol/day)	< 90 $\mu\text{g}/\text{day}$ (535 nmol/day)
Plasma	< 100 pg/ml	< 600 pg/ml

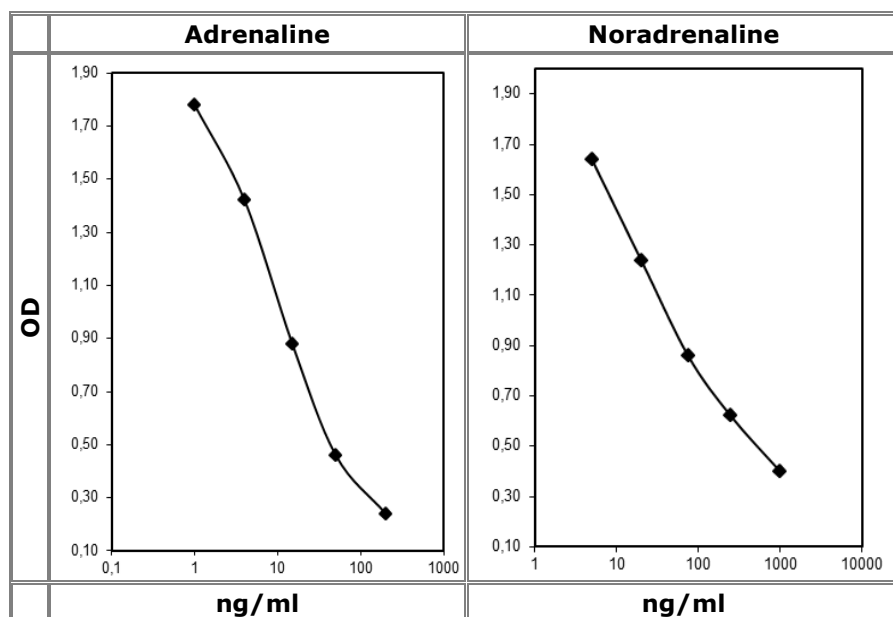
7.1 Quality control

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

Analytical Sensitivity	LOD		Adrenaline	Noradrenaline
		Urine (ng/ml)	0.9	1.7
	Plasma (pg/ml)	0.01	0.04	
	LOQ	Urine (ng/ml)	0.7	2.5
Plasma (pg/ml)		18.1	93	

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)	
		Adrenaline	Noradrenaline
	Derivatized Adrenaline	100	0.08
	Derivatized Noradrenaline	0.13	100
	Derivatized Dopamine	< 0.01	0.03
	Metanephrine	0.18	< 0.01
	Normetanephrine	< 0.01	0.16
	3-Methoxytyramine	< 0.01	< 0.01
	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol	< 0.01	< 0.01
	Tyramine	< 0.01	< 0.01
	Phenylalanine, Caffeinic acid, L-Dopa, Homovanillic acid, Tyrosine, 3-Methoxy-4-hydroxymandelic acid	< 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	1358 ± 194	14.3
	3	267 ± 35	13.1		3	3363 ± 374	11.1
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	1232 ± 134	10.9
	3	226 ± 39.5	17.4		3	3283 ± 302	9.2

Linearity		Serial dilution up to	Range (%)	Mean (%)
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













Recovery		Mean (%)	Range (%)	Range
Adrenaline	Urine	106	94 - 120	4.5 - 53.5 ng/ml
	Plasma	105	88 - 117	9.1 - 4268 pg/ml
Noradrenaline	Urine	103	91 - 113	58.6 - 230 ng/ml
	Plasma	87	75 - 107	51 - 16 735 pg/ml

9. References/Literature

- (1) Kim et al. Vitamin C prevents stress-induced damage on the heart caused by the death of cardiomyocytes, through the down-regulation of the excessive production of catecholamine, TNF- α , and ROS production in GULO(-I-) Vit C-Insufficient mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 65:573-583 (2013)
- (2) Bada et al. Peripheral vasodilatation determines cardiac output in exercising humans: insight from atrial pacing. *The Journal of Physiology*, 590(8):2051-2060 (2012)
- (3) Parks et al. Employment and work schedule are related to telomere length in women. *Occupational & Environmental Medicine* 68(8):582-589 (2011)

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

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		For research use only!

2-CAT ELISA Fast Track

Deutsch

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

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

Adrenalin und Noradrenalin 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 unbekanntenen 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.
- (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 Kiteticket angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (15) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (16) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (17) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe Sicherheitsdatenblatt (MSDS). 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.

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.

Sammelurin

Hinweise unter *Probenmaterial und Lagerung* beachten! Ist der Säuregehalt des 24h-Sammelurins zu hoch, reicht die Pufferkapazität des Extraktionspuffers nicht aus. In der Folge werden die Katecholamine nicht mehr ausreichend extrahiert.

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 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufzubewahren. Die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 1 Monat stabil, wenn sie bei 2 - 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

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Gebrauchsfertig
Inhalt:	4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Volumen:	2 x 4 Folien	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate - 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	2 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege Anti-Kaninchen Immunglobuline konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	2 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel rot	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	2 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel schwarz	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution - Gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	2 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel hellgrau	
BA E-0131	ADR MN	Adrenaline Microtiter Strips - Gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem blauen wiederverschließbaren Beutel	
BA E-0231	NAD NMN	Noradrenaline Microtiter Strips - Gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem gelben wiederverschließbaren Beutel	
BA E-6110	ADR-AS	Adrenaline Antiserum - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen Anti-Adrenalin Antikörper, blau gefärbt	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau	
BA E-6210	NAD-AS	Noradrenaline Antiserum - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen Anti-Noradrenalin Antikörper, gelb gefärbt	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel gelb	
BA R-0050	ADJUST-BUFF	Adjustment Buffer - Gebrauchsfertig
Inhalt:	TRIS Puffer zur pH-Wert Einstellung	
Volumen:	1 x 4 ml/ Fläschchen, Deckel grün	

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckel-farbe	Konzentration ng/ml		Konzentration nmol/l		Volumen/Fläschchen
			ADR	NAD	ADR	NAD	
BA R-6601	STANDARD A	weiß	0	0	0	0	4 ml
BA R-6602	STANDARD B	hellgelb	1	5	5,5	30	4 ml
BA R-6603	STANDARD C	orange	4	20	22	118	4 ml
BA R-6604	STANDARD D	dunkelblau	15	75	82	443	4 ml
BA R-6605	STANDARD E	hellgrau	50	250	273	1478	4 ml
BA R-6606	STANDARD F	schwarz	200	1000	1092	5910	4 ml
BA R-6651	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC Report angegeben.				4 ml
BA R-6652	CONTROL 2	dunkelrot					4 ml

Umrechnung: Adrenalin (ng/ml) x 5,46 = Adrenalin (nmol/l)
 Noradrenalin (ng/ml) x 5,91 = Noradrenalin (nmol/l)

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

BA R-6611 ACYL-BUFF **Acylation Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Leicht basischer Puffer zur Azylierung mit quecksilberfreien Stabilisatoren

Volumen: 1 x 20 ml/ Fläschchen, Deckel weiß

BA R-6612 ACYL-REAG **Acylation Reagent** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Azylierungsreagenz in DMF und DMSO

Volumen: 1 x 3 ml/ Fläschchen, Deckel hellrot

Mögliche Gefahren:



H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
 H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
 H319 Verursacht schwere Augenreizung.

BA R-6613 ASSAY-BUFF **Assay Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 1M Salzsäure mit quecksilberfreien Stabilisatoren

Volumen: 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel hellgrau

BA R-6614 COENZYME **Coenzyme** - Gebrauchsfertig

Inhalt: S-adenosyl-L-methionine

Volumen: 1 x 4 ml/ Fläschchen, Deckel lila

BA R-6615 ENZYME **Enzyme** - Lyophilisat

Inhalt: Catechol-O-methyltransferase

Volumen: 4 Fläschchen, Deckel hellrosa

BA R-6617 EXTRACT-BUFF **Extraction Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Carbonatpuffer

Volumen: 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel braun

BA R-6618 EXTRACT-PLATE 48 **Extraction Plate** - Gebrauchsfertig

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

BA R-6619 HCL **Hydrochloric Acid** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 0,025 M Salzsäure, gelb gefärbt

Volumen: 1 x 20 ml/ Fläschchen, Deckel dunkelgrün

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
- Vortex-Mischer
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- Saugfähige Unterlage

5. Probenmaterial und Lagerung

Plasma

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

Lagerung: bis zu 6 Stunden bei 2 - 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 2-8 °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.

Die Reaktion des Antiserums, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Je höher die Temperatur desto höher die Absorption. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch variierende Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassay liegt zwischen 20 – 25 °C. Es wird empfohlen, dies mit einem Thermometer zu überprüfen.

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: 1 Monat bei 2 – 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!

6.2 Probenvorbereitung, Extraktion und Azylierung

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 – 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 – 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 – 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 – 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 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.				
14.	Je 150 µl HCL in alle Kavitäten pipettieren.				
15.	EXTRACT-PLATE 48 mit FOIL abdecken und für 10 Min bei RT (20 – 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:				
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">Adrenalin</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">100 µl</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">Noradrenalin</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">20 µl</td> </tr> </table>	Adrenalin	100 µl	Noradrenalin	20 µl
Adrenalin	100 µl	Noradrenalin	20 µl		

6.3 Adrenalin ELISA

1.	Jeweils 25 µl Enzymlösung (siehe 6.1) in die entsprechenden Kavitäten der ADR MN pipettieren.
2.	Je 100 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Proben in die Kavitäten pipettieren.
3.	Für 30 Min bei RT (20 – 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 – 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 – 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 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden!
11.	100 µl STOP-SOLN in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte 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 12 NAD NMN pipettieren.
2.	Je 20 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Proben in die Kavitäten pipettieren.
3.	Für 30 Min bei RT (20 – 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 – 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 – 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 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden!
11.	100 µl STOP-SOLN in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte 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 .

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Adrenalin		Noradrenalin	
	Urin	0,7 - 200 ng/ml	2,5 - 1000 ng/ml	
Plasma	18 - 6667 pg/ml	93 - 33 333 pg/ml		

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntenen 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.: spline, 4- parameter, akima) 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: $\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$

Plasmaproben

Die aus der Kurve abgelesenen Konzentrationen müssen durch **30 dividiert** werden.

Umrechnung

Adrenalin (ng/ml) x 5.46 = Adrenalin (nmol/l)

Noradrenalin (ng/ml) x 5.91 = Noradrenalin (nmol/l)

Erwartete Referenzwerte

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

	Adrenalin	Noradrenalin
Sammelurin	< 20 µg/Tag (110 nmol/Tag)	< 90 µg/Tag (535 nmol/Tag)
Plasma	< 100 pg/ml	< 600 pg/ml

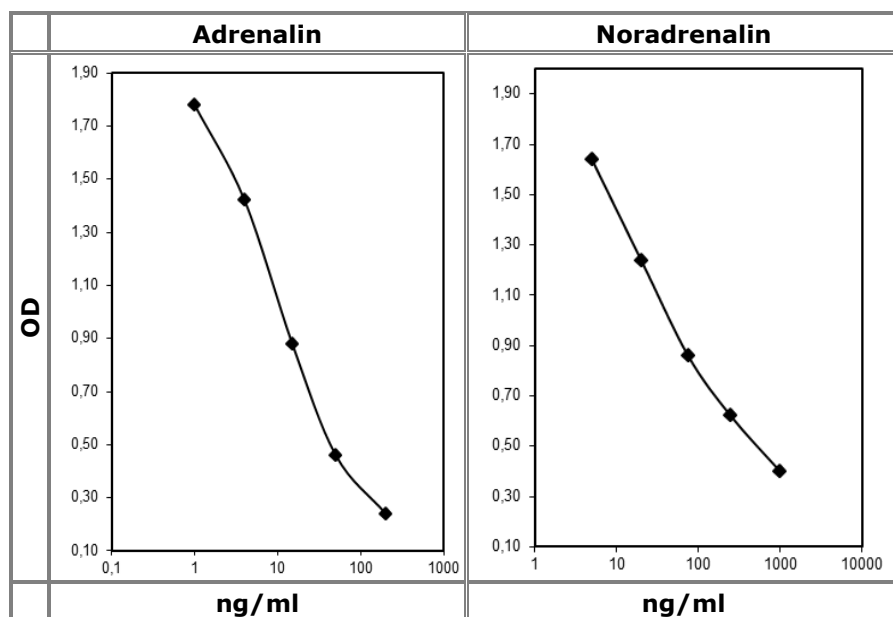
7.1 Qualitätskontrolle

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

Analytische Sensitivität	LOD	Urine (ng/ml)	Adrenalin	Noradrenalin
		Plasma (pg/ml)	0,9	1,7
	LOQ	Urine (ng/ml)	0,01	0,04
		Plasma (pg/ml)	0,7	2,5
			18,1	93

Analytische Spezifität (Kreuzreaktion)	Substanz	Kreuzreaktion (%)	
		Adrenalin	Noradrenalin
	Derivatisiertes Adrenalin	100	0,08
	Derivatisiertes Noradrenalin	0,13	100
	Derivatisiertes Dopamin	< 0,01	0,03
	Metanephrin	0,18	< 0,01
	Normetanephrin	< 0,01	0,16
	3-Methoxytyramin	< 0,01	< 0,01
	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol	< 0,01	< 0,01
	Tyramin	< 0,01	< 0,01
	Phenylalanin, Coffeinsäure, L-Dopa, Homovanillinsäure, Tyrosin, 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure	< 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	1358 ± 194	14,3
	3	267 ± 35	13,1		3	3363 ± 374	11,1

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	1232 ± 134	10,9
	3	226 ± 39,5	17,4		3	3283 ± 302	9,2

Linearität			Serielle Verdünnung bis	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	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







Wiederfindung			Mittelwert (%)	Bereich (%)	Bereich
	Adrenalin	Urin	106	94 - 120	4,5 - 53,5 ng/ml
		Plasma	105	88 - 117	9,1 - 4268 pg/ml
	Noradrenalin	Urin	103	91 - 113	58,6 - 230 ng/ml
		Plasma	87	75 - 107	51 - 16 735 pg/ml

9. Referenzen/Literatur

- (1) Kim et al. Vitamin C prevents stress-induced damage on the heart caused by the death of cardiomyocytes, through the down-regulation of the excessive production of catecholamine, TNF- α , and ROS production in GULO(-I-) Vit C-Insufficient mice. Free Radical Biology and Medicine, 65:573-583 (2013)
- (2) Bada et al. Peripheral vasodilatation determines cardiac output in exercising humans: insight from atrial pacing. The Journal of Physiology, 590(8):2051-2060 (2012)
- (3) Parks et al. Employment and work schedule are related to telomere length in women. Occupational & Environmental Medicine 68(8):582-589 (2011)

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

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer	RUO	Nur für Forschungszwecke