

Instructions for use
Dopamine RIA **Fast Track**

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

REF**BA R-6300****IVD****200 kBq**

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

¹²⁵I – Radioimmunoassay for the quantitative determination of dopamine in plasma and urine.

Dopamine is extracted by using a cis-diol- specific affinity gel, acylated and then converted enzymatically. The assay procedure follows the basic principle of radioimmunoassay, involving competition between a radioactive and a non-radioactive antigen for a fixed number of antibody binding sites. The amount of ¹²⁵I-labelled antigen bound to the antibody is inversely proportional to the analyte concentration of the sample. When the system is in equilibrium, the antibody bound radioactivity is precipitated with a second antibody in the presence of polyethylene glycol. The precipitate is counted in a gamma counter. Quantification of unknown samples is achieved by comparing their activity with a reference curve prepared with known standards.

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 pheochromocytoma. 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 different 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 Precautions, 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 sample as indicated in *Intended Use* (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) 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 - with the exception of Precipitating Reagent - 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 the dilution or reconstitution purposes use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (7) The radioactive material (¹²⁵Iodine, half life 60 days, emitting ionizing X-radiation with 28 keV and G-radiation with 35.5 keV) may be received, acquired, possessed and used only by physicians, laboratories or hospitals. In compliance with regulations, a copy of the customer's current radioisotope license must be on file with the supplier. Orders cannot be shipped until the license is received by the supplier (Radiation Protection Act of June 30, 1989).
- (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 tubes 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) 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 available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (16) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (17) 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.
- (18) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of 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! If the percentage of the final concentration of acid is too high, the buffer capacity of the Extraction Buffer is insufficient. As a consequence dopamine will not be extracted adequately.

2.2.2 Drug interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of dopamine 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.

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:	1 x 4 foils	
BA R-0025	PREC-REAG	Precipitating Reagent - Ready to use
Content:	Goat anti-rabbit serum in PEG phosphate buffer	
Volume:	1 x 55 ml/vial, white 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-0050	ADJUST-BUFF	Adjustment Buffer - Ready to use
Content:	TRIS buffer	
Volume:	1 x 4 ml/vial, green cap	
BA R-0320	¹²⁵I DOP	¹²⁵I - Dopamine - Ready to use
Content:	¹²⁵ I labeled Dopamine, red coloured	
Volume:	1 x 5.5 ml/vial, dark green cap	
Hazards identification:		

Radioactive, activity < 200 kBq

BA R-6310 AS DOP **Dopamine Antiserum** - Ready to use

Content: Rabbit anti- Dopamine antibody, green coloured

Volume: 1 x 5.25 ml/vial, dark green cap

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/ Cap	Concentration ng/ml	Concentration nmol/l	Volume/ Vial
			DOP	DOP	
BA R-6601	STANDARD A	white	0	0	4 ml
BA R-6602	STANDARD B	light yellow	10	65	4 ml
BA R-6603	STANDARD C	orange	40	261	4 ml
BA R-6604	STANDARD D	dark blue	150	980	4 ml
BA R-6605	STANDARD E	light grey	500	3 265	4 ml
BA R-6606	STANDARD F	black	2 000	13 060	4 ml
BA R-6609	STANDARD A/B	light purple	4.5	29	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: Dopamine (ng/ml) x 6.53 = Dopamine (nmol/l)

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

*for the determination of dopamine in plasma the additional **Standard A/B** is mandatory!**BA R-6611** ACYL-BUFF **Acylation Buffer** - Ready to use

Content: Buffer with light alkaline pH

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: 2 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-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 – 1000 µl
- Polystyrene tubes and suitable rack
- Temperature controlled water bath, heating block or incubator (37 °C)
- Centrifuge capable of at least 3,000 x g
- Suitable device for aspirating or decanting
- Shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Gamma counter
- Vortex mixer
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled or ultra-pure)

5. Sample collection and storage

Plasma

Whole blood should be collected by venipuncture into centrifuge tubes containing EDTA as anti-coagulant (e.g. Monovette™ or Vacuette™ for plasma) and centrifuged at room temperature immediately after collection.

Haemolytic and especially 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. 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.

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 – with the exception of Precipitating Reagent - to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the assay tubes accordingly. Duplicates are recommended.

⚠ *Pipetted liquids should not adhere to the wall of the RIA tubes. If necessary please centrifuge the tubes for 1 minute at 500 x g to spin down adhering liquids.*

6.1 Preparation of reagents

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

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

1. Pipette 10 µl of standards and controls , 10 µl of 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 the plate with adhesive foil. Incubate for 30 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
6. Remove the foil and empty the plate. Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
7. Pipette 1 ml water (deionized, distilled or ultra-pure) 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 150 µl of Acylation Buffer into all wells.				
9. Pipette 25 µl of Acylation Reagent into all wells.				
10. Incubate 15 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).				
11. Empty the plate. Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.				
12. Pipette 1 ml water (deionized, distilled or ultra-pure) 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.				
13. Pipette 150 µl of Hydrochloric Acid into all wells.				
14. Cover plate with adhesive foil. Incubate 10 min at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Remove the foil.				
 Do not decant the supernatant thereafter!				
The following volumes of the supernatant are needed for the subsequent RIA:				
<table border="1" style="display: inline-table; margin-right: 20px;"> <tr> <td>Dopamine (standards, controls, urine)</td> <td>10 µl</td> </tr> </table> <table border="1" style="display: inline-table;"> <tr> <td>Dopamine (plasma)</td> <td>25 µl</td> </tr> </table>	Dopamine (standards, controls, urine)	10 µl	Dopamine (plasma)	25 µl
Dopamine (standards, controls, urine)	10 µl			
Dopamine (plasma)	25 µl			

6.3 Dopamine RIA

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

1. Pipette 10 µl of Hydrochloric Acid into the tubes for the NSB .
2. Pipette 10 µl of the extracted standards and controls , 10 µl of the extracted urine samples and 25 µl of the extracted plasma samples into the respective tubes.
3. Pipette 25 µl of Enzyme Solution (refer to 6.1) into all tubes (except totals).
4. Mix thoroughly and incubate for 30 min at 37 °C .
5. Pipette 50 µl of the ¹²⁵ I Dopamine into all tubes .
6. Pipette 50 µl of Dopamine Antiserum into all tubes (except totals and NSB) ; mix thoroughly.
7. Cover tubes. Incubate for 15 - 20 h (overnight) at 2 - 8 °C . Alternatively incubate for 2 h at RT (20 - 25°C) on a shaker (approx. 600 rpm).
8. Mix the chilled (2 - 8 °C) Precipitating Reagent thoroughly, pipette each 500 µl into all tubes (except totals) , and mix on a vortex.
9. Incubate for 15 min at 2 - 8 °C .
10. Centrifuge for 15 min at 3,000 x g , if possible in a refrigerated centrifuge.
11. Decant or aspirate the supernatant carefully (except totals). Blot the tubes dry and leave them upside down for 2 minutes.
12. Count all tubes for 1 min in a gamma counter.


7. Calculation of results

Measuring range	Dopamine	
	Urine	3.0 - 2000 ng/ml
Plasma	29 - 26667 pg/ml	

Subtract the mean cpm of the non-specific binding NSB from the mean cpm of standards, controls and samples.

The standard curve from which the concentrations in the samples can be read off, is obtained by plotting the percentage of (B-NSB)/ (B₀-NSB) measured for 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 counts are decreasing with increasing concentrations of the analyte. Counts 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 1 & 2** can be read directly from the standard curve.

Calculate the 24 h excretion for each urine sample: **µg/24h = µg/l x l/24h**

Plasma samples

The read concentrations of the **plasma samples** have to be **divided by 75**.

Conversion

Dopamine (ng/ml) x 6.53 = Dopamine (nmol/l)

Expected reference values

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

	Dopamine
24-hour urine	< 600 µg/day (3 900 nmol/day)
Plasma	< 100 pg/ml

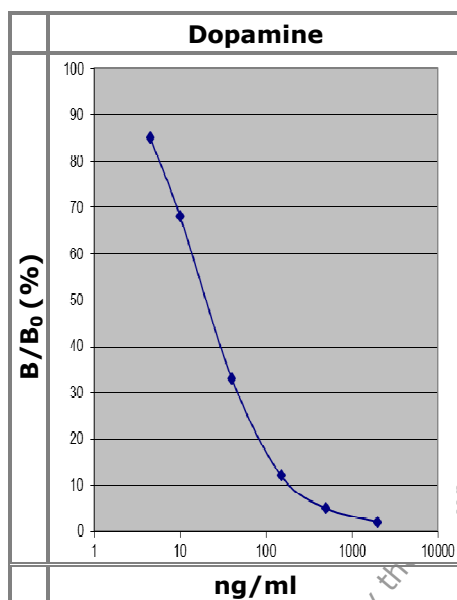
7.1 Quality control

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. Use controls at both normal and pathological levels. The kit controls 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 curve



Example, do not use for calculation!



8. Assay characteristics

Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	Dopamine	
	Urine	3.0 ng/ml
	Plasma	29 pg/ml

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

Precision							
Intra-Assay Urine (n = 40)				Intra-Assay Plasma (n = 40)			
	Sample	Range (ng/ml)	CV (%)		Sample	Range (ng/ml)	CV (%)
Dopamine	1	283 ± 44.3	16.1	Dopamine	1	346 ± 30.8	8.8
	2	338 ± 54.7	15.9		2	880 ± 111	12.3
	3	594 ± 170	28.7		3	2588 ± 742	24.0
Inter-Assay Urine (n = 18)				Inter-Assay Plasma (n = 20)			
	Sample	Range (ng/ml)	CV (%)		Sample	Range (ng/ml)	CV (%)
Dopamine	1	225 ± 34.7	15.4	Dopamine	1	260 ± 74.7	28.8
	2	272 ± 55.8	20.5		2	761 ± 173	22.7
	3	452 ± 118	26.0		3	2216 ± 564	25.5

Linearity			Serial dilution up to	Range (%)	Mean (%)
	Dopamine	Urine	1:128	90 - 121	105
	Plasma	1:128	67 - 90	83	

Recovery			Concentration range	Range (%)	Mean (%)
	Dopamine	Urine	137 - 1823 ng/ml	79 - 126	110
	Plasma	20.3 - 5158 pg/ml	74 - 94	85	

Method Comparison versus HPLC*	Dopamine	Urine	HPLC = 1.07 RIA + 0.01	r = 0.98; n = 21
		Plasma	HPLC = 1.00 RIA + 0.003	r = 0.96; n = 20













*The concentrations were assessed using both the RIA and the HPLC method (external QC samples from UK NEQAS). The correlation between RIA and HPLC is excellent. This means, that the RIA measure equally good when compared to the UK NEQAS HPLC data. Please take in mind, that the UK control values are the mean of about 40 different HPLC users, and contain always one pathological sample per sending.

9. References/Literature

- (1) Rostrum et al. Physiological effects of combined thermal and electrical muscle stimulation (cTEMS) in healthy individuals A pilot study. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 72(3):237-245 (2012)
- (2) Milman et al. Opioid Receptor Blockade Prevents Exercise-Associated Autonomic Failure in Humans. Diabetes, 61(6):1609-1615 (2012)
- (3) Vele et al. Opioid Receptor Blockade Improves Hypoglycemia-Associated Autonomic Failure in Type 1 Diabetes Mellitus. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 96(11): 3424-3431 (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!

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

¹²⁵I – Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Dopamin in Plasma und Urin.

Dopamin wird mittels eines cis-diol-spezifischen Boronat-Affinitätsgels extrahiert, danach azyliert und anschließend enzymatisch umgewandelt.

Die Durchführung des RIA-Tests erfolgt nach den Grundprinzipien des Radioimmunoassays. Radioaktiv markiertes Antigen und nicht markiertes Antigen binden kompetitiv an eine definierte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Anschließend werden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem zweiten Antikörper in Anwesenheit von PEG gefällt. Das Präzipitat wird nach zentrifugieren und dekantieren oder absaugen des Überstands in einem Gamma-Counter gemessen. Die Menge an radioaktiv gebundenem Antigen ist indirekt proportional zur Antigenkonzentration der Probe.

Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve und Abgleich der gemessenen Aktivitäten ermittelt.

1.2 Klinische Anwendung

Die Katecholamine Adrenalin (Epinephrine), Noradrenalin (Norepinephrine) 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 sympatho-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 Referenzbereiche können ein Hinweis auf neuroendokrine Tumore sein.

Des Weiteren werden in der Literatur noch zahlreiche Krankheitsbilder wie z.B. Hypertonie, degenerative Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems, Schizophrenie und manische Depression mit einem 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 bestimmt. 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) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (4) Alle Reagenzien des Kits, mit Ausnahme des **PREC-REAG**, sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (5) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.
- (6) Das radioaktive Material (¹²⁵Iod, Halbwertszeit 60 Tage, gibt eine ionisierende Röntgenstrahlung mit 28 keV und eine Gammastrahlung mit 35,5 keV ab) darf nur von Ärzten, Laboren oder Krankenhäusern in Empfang genommen, erworben, besessen und verwendet werden. Gemäß den Vorschriften muss dem Lieferanten ein Exemplar der aktuellen strahlenschutzrechtlichen Genehmigung des Kunden vorliegen. Bestellungen können erst versandt werden, wenn die Genehmigung beim Lieferanten eingegangen ist (Strahlenschutzverordnung vom 30. Juni 1989).
- (7) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (8) 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.

- (9) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Röhrchen sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (10) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (11) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (12) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen der Kitkontrollen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (13) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (14) 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.
- (15) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.
- (16) 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.
- (17) 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 ein Präzipitat oder die Fibrinfäden enthalten oder die hämolytisch oder lipämisch sind, können zu ungenauen Ergebnissen führen.

Sammelurin

Probenvorbereitung beachten! Ist der Säuregehalt des 24 Stunden-Sammelurins zu hoch, reicht die Pufferkapazität des Extraktionspuffers nicht aus. In der Folge wird Dopamin nicht mehr quantitativ extrahiert.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des Dopamin-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.

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA D-0090

FOILS

Adhesive Foil - Gebrauchsfertig

Inhalt: 4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel

Volumen: 1 x 4 Folien

BA R-0025

PREC-REAG

Precipitating Reagent - Gebrauchsfertig

Inhalt: Ziege anti-Kaninchen Serum in PEG Phosphatpuffer

Volumen: 1 x 55 ml/ Fläschchen, Deckel weiß

BA R-6618

EXTRACT-PLATE 48

Extraction Plate - Gebrauchsfertig

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

BA R-0050


ADJUST-BUFF

Adjustment Buffer - Gebrauchsfertig

Inhalt: TRIS Puffer

Volumen: 1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel grün

BA R-0320 ¹²⁵I DOP **¹²⁵I – Dopamine** - Gebrauchsfertig

Inhalt: ¹²⁵I markiertes Dopamin, rot gefärbt
 Volumen: 1 x 5,5 ml/ Fläschchen, Deckel dunkelgrün
 Mögliche Gefahren: 

Radioaktiv, Aktivität < 200 kBq

BA R-6310 AS DOP **Dopamine Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Kaninchen Anti- Dopamin Antikörper, grün gefärbt
 Volumen: 1 x 5,25 ml/Fläschchen, Deckel dunkelgrün

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckel-farbe	Konzentration	Konzentration	Volumen/ Fläschchen
			ng/ml	nmol/l	
			DOP	DOP	
BA R-6601	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA R-6602	STANDARD B	hellgelb	10	65	4 ml
BA R-6603	STANDARD C	orange	40	261	4 ml
BA R-6604	STANDARD D	dunkelblau	150	980	4 ml
BA R-6605	STANDARD E	hellgrau	500	3265	4 ml
BA R-6606	STANDARD F	schwarz	2000	13060	4 ml
BA R-6609	STANDARD A/B	helllila	4.5	29	4 ml
BA R-6651	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und		4 ml
BA R-6652	CONTROL 2	dunkelrot	Akzeptanzbereiche sind dem QC-Report zu entnehmen.		4 ml

Umrechnung: Dopamin (ng/ml) x 6,53 = Dopamin (nmol/l)

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

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

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

Inhalt: Puffer mit leicht basischem pH
 Volumen: 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel weiß

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

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

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-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: 2 Fläschchen, Deckel hellrosa

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

Inhalt: Carbonatpuffer

Volumen: 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel braun

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 – 1000 µl
- RIA-Röhrchen (Polystyrol) mit passendem Ständer
- Absaug- oder Dekantiervorrichtung
- Wasserbad, Heizblock oder Wärmeschrank (37 °C)
- Zentrifuge (möglichst mit Kühlung), mind. 3000 x g
- Plattenschüttler (Schüttelhub von 3 mm, ca. 600 rpm)
- Vortex-Mischer
- Gamma-Counter
- 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.

Urin


Es kann Spontan- 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 des Sammelurins zu bestimmen und für die spätere Auswertung der Ergebnisse zu notieren.* Ist der Säuregehalt des 24 Stunden-Sammelurins zu hoch, reicht die Pufferkapazität des Extraktionspuffers nicht aus. In der Folge werden die Katecholamine nicht mehr quantitativ extrahiert.

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, mit Ausnahme des PREC-REAG, müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt werden. Das Beschriften der Röhrchen ist erforderlich. Es empfiehlt sich, Doppelbestimmungen anzusetzen.

 *Es ist erforderlich, die Röhrchen 1 Min bei 500 x g zu zentrifugieren, falls sich nach den jeweiligen Pipettierschritten Flüssigkeitsreste am Röhrchenrand befinden sollten.*


6.1 Vorbereitung der Reagenzien


Enzymlösung

Den Inhalt des Fläschchens ENZYME mit **1 ml Wasser** (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) lösen und gut mischen. **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

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

1.	Jeweils 10 µl der Standards, Kontrollen, Urinproben und 300 µl der Plasmaproben in die entsprechenden Kavitäten der EXTRACT-PLATE 48 pipettieren.				
2.	Jeweils 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.	Platte mit FOIL abdecken und für 30 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.				
6.	FOIL entfernen. Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.				
7.	1 ml Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in alle Kavitäten pipettieren. 5 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.				
8.	Jeweils 150 µl ACYL-BUFF in alle Kavitäten pipettieren.				
9.	Jeweils 25 µl ACYL-REAG in alle Kavitäten pipettieren.				
10.	15 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.				
11.	Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.				
12.	Je 1 ml Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in alle Kavitäten pipettieren. 5 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.				
13.	Jeweils 150 µl HCL in alle Kavitäten pipettieren.				
14.	Platte mit FOIL abdecken und für 10 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) schütteln.				
	Überstand anschließend nicht verwerfen bzw. Platte nicht ausleeren! Von den Überständen werden für den nachfolgenden RIA folgende Volumina benötigt:				
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">Dopamin (Standards + Urin)</td> <td style="text-align: center;">10 µl</td> <td style="text-align: center;">Dopamin (Plasma)</td> <td style="text-align: center;">25 µl</td> </tr> </table>	Dopamin (Standards + Urin)	10 µl	Dopamin (Plasma)	25 µl
Dopamin (Standards + Urin)	10 µl	Dopamin (Plasma)	25 µl		

6.3 Dopamin RIA

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

1.	Jeweils 10 µl HCL in die Röhrchen für die NSB pipettieren.
2.	Jeweils 10 µl der extrahierten Standards und Kontrollen , 10 µl der extrahierten Urinproben und 25 µl der extrahierten Plasmaproben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
3.	Jeweils 25 µl Enzymlösung (siehe 6.1) in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T) pipettieren.
4.	Röhrchen gut mischen und 30 Min bei 37 °C inkubieren.
5.	Je 50 µl ¹²⁵I DOP in alle Röhrchen pipettieren.
6.	Je 50 µl AS DOP in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T und NSB) pipettieren.
7.	Röhrchen abdecken und 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren. Alternativ 2 Stunden bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
8.	Das vorgekühlte (2 - 8 °C) PREC-REAG gründlich aufschütteln und jeweils 500 µl in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T) pipettieren. Kurz mischen.
9.	15 Min bei 2 - 8 °C inkubieren.
10.	15 Min bei 3000 x g - möglichst mit Kühlung - zentrifugieren.
11.	Überstand absaugen <i>oder</i> vorsichtig dekantieren (außer Totalaktivität T) . Röhrchen ausklopfen und für 2 Minuten umgedreht stehen lassen.
12.	Röhrchen 1 Minute in einem Gamma-Counter messen .

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Dopamin	
	Urin	3,0 – 2000 ng/ml
	Plasma	29 – 26667 pg/ml

Der Mittelwert der cpm der Nicht-Spezifischen-Bindung NSB wird von den Mittelwerten der cpm der Standards, Kontrollen und Proben abgezogen.

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntenen Proben ermittelt werden kann, wird nach Auftragen der $(B-NSB)/(B_0-NSB)$ für die Standards im linearen Maßstab auf der y-Achse gegen die entsprechende Konzentration im logarithmischen Maßstab auf der x-Achse, erstellt.

Zur Kurvenberechnung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) verwendet.



Dieser Assay ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die Counts mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. Counts die unterhalb der Counts 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 1 & 2** 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 **75 dividiert** werden.

Umrechnung

Dopamin (ng/ml) \times 6,53 = Dopamin (nmol/l)

Erwartete Referenzwerte

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

	Dopamin
Sammelurin	< 600 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ (3 900 nmol/Tag)
Plasma	< 100 pg/ml

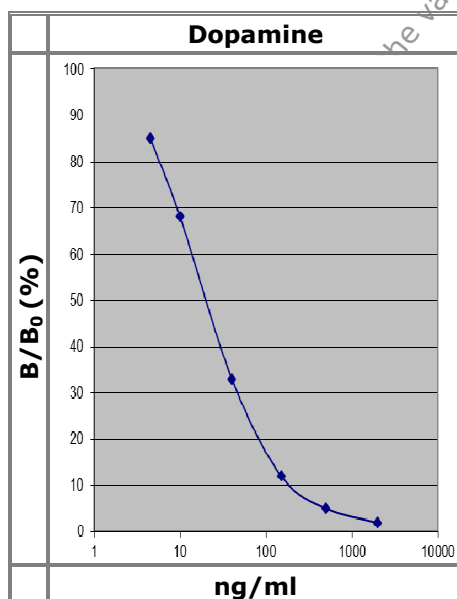
7.1 Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie die Kitkontrollen und andere kommerzielle Kontrollproben im physiologischen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Diese Kontrollen müssen dabei wie unbekannte Proben behandelt werden. Die Kontrollproben müssen innerhalb der angegebenen Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

7.2 Typische Standardkurve



Beispiel, bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8. Testcharakteristika

Analytische Sensitivität (Limit of Detection)		Dopamin
	Urin	3,0 ng/ml
	Plasma	29 pg/ml

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

Präzision							
Intra-Assay Urin (n = 40)				Intra-Assay Plasma (n = 40)			
	Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)		Probe	Bereich (pg/ml)	CV (%)
Dopamin	1	283 ± 44,3	16,1	Dopamin	1	346 ± 30,8	8,8
	2	338 ± 54,7	15,9		2	880 ± 111	12,3
	3	594 ± 170	28,7		3	2588 ± 742	24,0
Inter-Assay Urin (n = 18)				Inter-Assay Plasma (n = 20)			
	Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)		Probe	Bereich (pg/ml)	CV (%)
Dopamin	1	225 ± 34,7	15,4	Dopamin	1	260 ± 74,7	28,8
	2	272 ± 55,8	20,5		2	761 ± 173	22,7
	3	452 ± 118	26,0		3	2216 ± 564	25,5

Linearität		Serielle Verdünnung bis:	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	Dopamin	Urin	1:128	90 - 121
		Plasma	1:128	67 - 90

Wiederfindung		Konzentrations- bereich	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	Dopamin	Urin	137 - 1823 ng/ml	79 - 126
		Plasma	20,3 - 5158 pg/ml	74 - 94

Methodenvergleich zur HPLC*	Dopamin	Urin	HPLC = 1,07 RIA + 0,01	r = 0,98; n = 21
		Plasma	HPLC = 1,00 RIA + 0,003	r = 0,96; n = 20

*Die Konzentrationen wurden durch RIA und HPLC Messungen ermittelt (externe QC Proben von UK NEQAS). Die Ergebnisse der RIA und HPLC Messungen korrelieren sehr gut. Bitte beachten Sie, dass es sich bei den externen Kontrollwerten um einen Mittelwert aus über 40 verschiedenen HPLC Usern handelt, und dass immer eine der Proben im pathologischen Bereich liegt.







9. Referenzen/Literatur

- (1) Rostrum et al. Physiological effects of combined thermal and electrical muscle stimulation (cTEMS) in healthy individuals A pilot study. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 72(3):237-245 (2012)
- (2) Milman et al. Opioid Receptor Blockade Prevents Exercise-Associated Autonomic Failure in Humans. Diabetes, 61(6):1609-1615 (2012)
- (3) Vele et al. Opioid Receptor Blockade Improves Hypoglycemia-Associated Autonomic Failure in Type 1 Diabetes Mellitus. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 96(11): 3424-3431 (2011)

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

⚠ 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