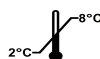


**Instructions for use**  
**2-CAT RIA Fast Track**

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

**REF****BA R-6500****IVD****CE****400 kBq**

**1. Introduction****1.1 Intended use and principle of the test**

<sup>125</sup>I – Radioimmunoassay 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 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 <sup>125</sup>I-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 a certain type 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 (<sup>125</sup>Iodine, 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 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.


## 4. Materials

### 4.1 Content of the kit

<b>BA D-0090</b>	<b>FOILS</b>	<b>Adhesive Foil</b> - Ready to use
Content:	Adhesive Foils in a resealable pouch	
Volume:	1 x 4 foils	
<b>BA R-0025</b>	<b>PREC-REAG</b>	<b>Precipitating Reagent</b> - Ready to use
Content:	Goat anti-rabbit serum in PEG phosphate buffer	
Volume:	2 x 55 ml/vial, white cap	
<b>BA R-6618</b>	<b>EXTRACT-PLATE 48</b>	<b>Extraction Plate</b> - Ready to use
Content:	2 x 48 well plates coated with boronate affinity gel in a resealable pouch	
<b>BA R-0050</b>	<b>ADJUST-BUFF</b>	<b>Adjustment Buffer</b> - Ready to use
Content:	TRIS buffer	
Volume:	1 x 4 ml/vial, green cap	
<b>BA R-0120</b>	<b><sup>125</sup>I ADR MN</b>	<b><sup>125</sup>I - Adrenaline</b> - Ready to use
Content:	<sup>125</sup> I labeled Adrenaline, red coloured	
Volume:	1 x 5.5 ml/vial, blue cap	
Hazards identification:		
	Radioactive, activity < 200 kBq	

**BA R-0220** <sup>125</sup>I **NAD** **NMN** **<sup>125</sup>I – Noradrenaline** - Ready to useContent: <sup>125</sup>I labeled Noradrenaline, red coloured

Volume: 1 x 5.5 ml/vial, yellow cap

Hazards identification: 

Radioactive, activity &lt; 200 kBq

**BA R-6110** **AS** **ADR** **Adrenaline Antiserum** - Ready to use

Content: Rabbit anti- Adrenaline antibody, blue coloured

Volume: 1 x 5.25 ml/vial, blue cap

**BA R-6210** **AS** **NAD** **Noradrenaline Antiserum** - Ready to use

Content: Rabbit anti- Noradrenaline antibody, yellow coloured

Volume: 1 x 5.25 ml/vial, yellow cap

**Standards and Controls** - Ready to use

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

Volume: 1 x 20 ml/vial, white cap

**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-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-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-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

1.	Pipette <b>10 µl</b> of <b>standards</b> and <b>controls</b> , <b>10 µl</b> of <b>urine samples</b> and <b>300 µl</b> of <b>plasma samples</b> into the respective wells of the <b>Extraction Plate</b> .				
2.	Add <b>250 µl</b> of <b>water</b> (deionized, distilled, or ultra-pure) to the wells with <b>standards, controls</b> and <b>urine samples</b> .				
3.	Pipette <b>50 µl</b> of <b>Assay Buffer</b> into all wells.				
4.	Pipette <b>50 µl</b> of <b>Extraction Buffer</b> into all wells.				
5.	Cover the plate with adhesive foil. Incubate for <b>30 min</b> at <b>RT</b> (20 - 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).				
6.	Remove the foil and empty the plate. Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.				
7.	Pipette <b>1 ml water</b> (deionized, distilled or ultra-pure) into all wells. Incubate the plate for <b>5 min</b> at <b>RT</b> (20 - 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.				
8.	Pipette <b>150 µl</b> of <b>Acylation Buffer</b> into all wells.				
9.	Pipette <b>25 µl</b> of <b>Acylation Reagent</b> into all wells.				
10.	Incubate <b>15 min</b> at <b>RT</b> (20 - 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).				
11.	Empty the plate. Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.				
12.	Pipette <b>1 ml water</b> (deionized, distilled, or ultra-pure) into all wells. Incubate the plate for <b>5 min</b> at <b>RT</b> (20 - 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.				
13.	Pipette <b>150 µl</b> of <b>Hydrochloric Acid</b> into all wells.				
14.	Cover plate with adhesive foil. Incubate <b>10 min</b> at <b>RT</b> (20 - 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). Remove the foil. <b>Do not decant the supernatant thereafter!</b>				
	The following volumes of the supernatant are needed for the subsequent RIA:				
	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"><b>Adrenaline</b></td> <td style="width: 25%;"><b>100 µl</b></td> <td style="width: 50%;"><b>Noradrenaline</b></td> <td style="width: 25%;"><b>20 µl</b></td> </tr> </table>	<b>Adrenaline</b>	<b>100 µl</b>	<b>Noradrenaline</b>	<b>20 µl</b>
<b>Adrenaline</b>	<b>100 µl</b>	<b>Noradrenaline</b>	<b>20 µl</b>		

## 6.3 Adrenaline RIA

1.	Pipette <b>100 µl</b> of <b>Hydrochloric Acid</b> into the tubes for the <b>NSB</b> .
2.	Pipette <b>100 µl</b> of the <b>extracted standards, controls</b> and <b>samples</b> into the respective tubes.
3.	Pipette <b>25 µl</b> of <b>Enzyme Solution</b> (refer to 6.1) into all tubes ( <b>except totals</b> ).
4.	Mix thoroughly and incubate for <b>30 min</b> at <b>37 °C</b> .
5.	Pipette <b>50 µl</b> of the <b><sup>125</sup>I Adrenaline</b> into <b>all tubes</b> .
6.	Pipette <b>50 µl</b> of <b>Adrenaline Antiserum</b> into <b>all tubes (except totals and NSB)</b> ; mix thoroughly.
7.	Cover tubes. Incubate for <b>15 - 20 h</b> (overnight) at <b>2 - 8 °C</b> . <b>Alternatively incubate for 2 h at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).</b>
8.	Mix the chilled (2 - 8 °C) <b>Precipitating Reagent</b> thoroughly, pipette each <b>500 µl</b> into <b>all tubes (except totals)</b> , and mix on a vortex.
9.	Incubate for <b>15 min</b> at <b>2 - 8 °C</b> .
10.	Centrifuge for <b>15 min</b> at <b>3,000 x g</b> , if possible in a refrigerated centrifuge.
11.	<b>Decant</b> or aspirate the <b>supernatant</b> carefully ( <b>except totals</b> ). Blot the tubes dry and leave them upside down for 2 minutes.
12.	<b>Count</b> all tubes for <b>1 min</b> in a gamma counter.

## 6.4 Noradrenaline RIA

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

## 7. Calculation of results

Measuring range		Adrenaline	Noradrenaline
	Urine	0.39 - 200 ng/ml	1.1 - 1 000 ng/ml
	Plasma	19 - 6 667 pg/ml	42 - 33 333 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)/ (B<sub>0</sub>-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:  $\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$

### Plasma samples

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

### Conversion

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

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

### Expected reference values

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

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

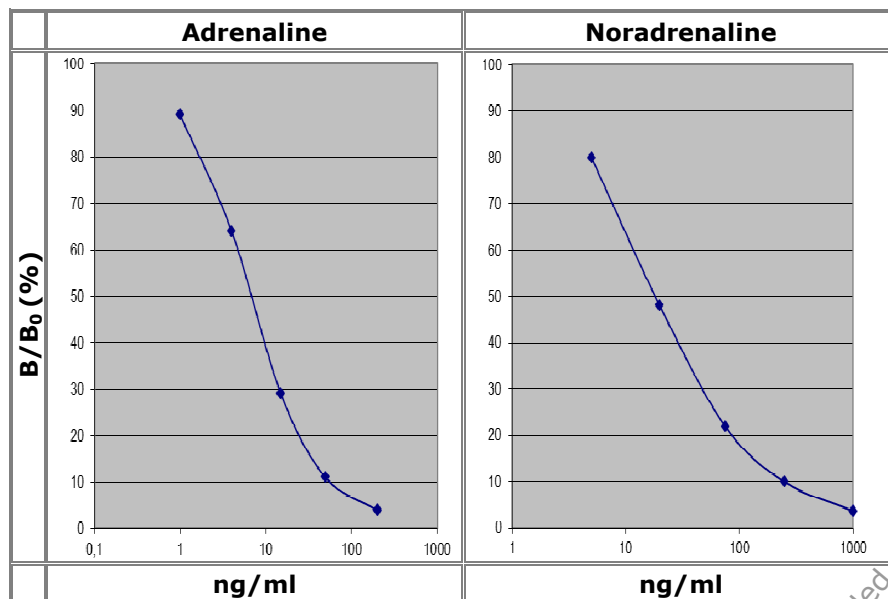
## 7.1 Quality control

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



Examples, do not use for calculation!



## 8. Assay characteristics

Analytical Sensitivity (Limit of Detection)		Adrenaline	Noradrenaline
	Urine	0.39 ng/ml	1.1 ng/ml
	Plasma	19 pg/ml	42 pg/ml

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	< 0.0007	< 0.01	
Phenylalanine, Caffeinic acid, L-Dopa, Homovanillic acid, Tyrosine, 3-Methoxy-4-hydroxymandelic acid	< 0.01	< 0.01	

Precision							
Intra-Assay Urine (n = 40)				Intra-Assay Plasma (n = 40)			
	Sample	Range (ng/ml)	CV (%)		Sample	Range (ng/ml)	CV (%)
Adrenaline	1	15.8 ± 1.1	7.0	Adrenaline	1	146 ± 17.4	12.0
	2	22.3 ± 1.7	7.4		2	389 ± 38.7	10.1
	3	45.2 ± 5.1	11.3		3	1 271 ± 88.4	7.0
Noradrenaline	1	86.8 ± 6.8	7.8	Noradrenaline	1	992 ± 85.8	9.3
	2	122 ± 10.9	8.9		2	1 811 ± 224	12.3
	3	244 ± 21.9	8.9		3	4 935 ± 663	13.4



Inter-Assay Urine (n = 18)				Inter-Assay Plasma (n = 20)			
	Sample	Range (ng/ml)	CV (%)		Sample	Range (ng/ml)	CV (%)
Adrenaline	1	15.5 ± 1.5	9.5	Adrenaline	1	129 ± 12.7	9.8
	2	21.0 ± 2.5	11.7		2	347 ± 31.9	9.2
	3	42.7 ± 5.0	11.7		3	1 139 ± 128	11.3
Noradrenaline	1	77.7 ± 8.5	10.9	Noradrenaline	1	754 ± 184	24.4
	2	104 ± 9.4	9.1		2	1 661 ± 176	10.9
	3	198 ± 22.7	11.5		3	4 049 ± 391	9.7

Linearity			Serial dilution up to	Range (%)	Mean (%)
	Adrenaline	Urine	1:128	99 - 114	105
		Plasma	1:128	107 - 113	110
	Noradrenaline	Urine	1:128	93 - 106	98
		Plasma	1:128	95 - 113	103

Recovery			Concentration range	Range (%)	Mean (%)
	Adrenaline	Urine	5.2 - 48.8 ng/ml	101 - 111	105
		Plasma	25.3 - 1 001 pg/ml	105 - 119	111
	Noradrenaline	Urine	62.9 - 292 ng/ml	99 - 107	102
		Plasma	377 - 4 457 pg/ml	80 - 101	92

Method Comparison versus HPLC*	Noradrenaline	Urine	HPLC = 1.23 RIA - 0.12	r = 0.99; n = 21
		Plasma	HPLC = 1.27 RIA - 0.14	r = 0.99; n = 20
	Adrenaline	Urine	HPLC = 0.95 RIA - 0.03	r = 0.99; n = 21
		Plasma	HPLC = 0.80 RIA - 0.03	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**

<sup>125</sup>I – Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin in Plasma und Urin.

Adrenalin und Noradrenalin werden 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, degenerativer 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) 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, 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.
- (6) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.
- (7) Das radioaktive Material (<sup>125</sup>Iod, 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).
- (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 Röhrchen 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 der Kitkontrollen 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) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe die Sicherheitsdatenblätter (MSDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (16) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.
- (17) 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.
- (18) 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 werden die Katecholamine nicht mehr quantitativ extrahiert.

### 2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns 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.

## 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:

2 x 55 ml/ Fläschchen, Deckel weiß

#### BA R-0050

ADJUST-BUFF

**Adjustment Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt:

TRIS Puffer

Volumen:

1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel grün

**BA R-0120** <sup>125</sup>I **ADR MN** <sup>125</sup>I – **Adrenaline** - GebrauchsfertigInhalt: <sup>125</sup>I markiertes Adrenalin, rot gefärbt

Volumen: 1 x 5,5 ml/ Fläschchen, Deckel blau

Mögliche Gefahren:



Radioaktiv, Aktivität &lt; 200 kBq

**BA R-0220** <sup>125</sup>I **NAD NMN** <sup>125</sup>I – **Noradrenaline** - GebrauchsfertigInhalt: <sup>125</sup>I markiertes Noradrenalin, rot gefärbt

Volumen: 1 x 5,5 ml/ Fläschchen, Deckel gelb

Mögliche Gefahren:



Radioaktiv, Aktivität &lt; 200 kBq

**BA R-6110** **AS ADR** **Adrenaline Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Kaninchen Anti- Adrenalin Antikörper, blau gefärbt

Volumen: 1 x 5,25 ml/Fläschchen, Deckel blau

**BA R-6210** **AS NAD** **Noradrenaline Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Kaninchen Anti- Noradrenalin Antikörper, gelb gefärbt

Volumen: 1 x 5,25 ml/Fläschchen, Deckel gelb

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

Inhalt: Puffer mit leicht basischem pH

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.

**Standards und Controls** - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckel-farbe	Konzentration ng/ml		Konzentration nmol/l		Volumen/Fläschchen
			ADR	NAD	ADR	NAD	
<b>BA R-6601</b>	<b>STANDARD A</b>	weiß	0	0	0	0	4 ml
<b>BA R-6602</b>	<b>STANDARD B</b>	hellgelb	1	5	5.5	30	4 ml
<b>BA R-6603</b>	<b>STANDARD C</b>	orange	4	20	22	118	4 ml
<b>BA R-6604</b>	<b>STANDARD D</b>	dunkelblau	15	75	82	443	4 ml
<b>BA R-6605</b>	<b>STANDARD E</b>	hellgrau	50	250	273	1478	4 ml
<b>BA R-6606</b>	<b>STANDARD F</b>	schwarz	200	1000	1092	5910	4 ml
<b>BA R-6651</b>	<b>CONTROL 1</b>	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.				4 ml
<b>BA R-6652</b>	<b>CONTROL 2</b>	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

<b>BA R-6613</b>	<b>ASSAY-BUFF</b>	<b>Assay Buffer</b> - Gebrauchsfertig
Inhalt:	1M Salzsäure mit quecksilberfreien Stabilisatoren	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel hellgrau	
<b>BA R-6614</b>	<b>COENZYME</b>	<b>Coenzyme</b> - Gebrauchsfertig
Inhalt:	S-adenosyl-L-methionine	
Volumen:	1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel lila	
<b>BA R-6615</b>	<b>ENZYME</b>	<b>Enzyme</b> - Lyophilisat
Inhalt:	Catechol-O-methyltransferase	
Volumen:	4 Fläschchen, Deckel hellrosa	
<b>BA R-6617</b>	<b>EXTRACT-BUFF</b>	<b>Extraction Buffer</b> - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Carbonatpuffer	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel braun	
<b>BA R-6618</b>	<b>EXTRACT-PLATE 48</b>	<b>Extraction Plate</b> - Gebrauchsfertig
Inhalt:	2 x 48 Well Platte beschichtet mit Boronat Affinitätsgel in einem wiederverschließbaren Beutel.	
<b>BA R-6619</b>	<b>HCL</b>	<b>Hydrochloric Acid</b> - 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 einer für EDTA-Plasma vorgesehenen Monovette (z.B. von Sarstedt) 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 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 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 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.*


## 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

1.	Jeweils <b>10 µl</b> der <b>Standards, Kontrollen, Urinproben</b> und <b>300 µl</b> der <b>Plasmaproben</b> in die entsprechenden Kavitäten der <b>ETRACT-PLATE 48</b> pipettieren.		
2.	Jeweils <b>250 µl Wasser</b> (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) zu den <b>Standards, Kontrollen</b> und <b>Urinproben</b> hinzugeben.		
3.	Je <b>50 µl ASSAY-BUFF</b> in alle Kavitäten pipettieren.		
4.	Je <b>50 µl ETRACT-BUFF</b> in alle Kavitäten pipettieren.		
5.	Platte mit <b>FOIL</b> abdecken und für <b>30 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.		
6.	<b>FOIL</b> entfernen. Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.		
7.	<b>1 ml Wasser</b> (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in alle Kavitäten pipettieren. <b>5 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren. Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.		
8.	Jeweils <b>150 µl ACYL-BUFF</b> in alle Kavitäten pipettieren.		
9.	Jeweils <b>25 µl ACYL-REAG</b> in alle Kavitäten pipettieren.		
10.	<b>15 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.		
11.	Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.		
12.	Je <b>1 ml Wasser</b> (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in alle Kavitäten pipettieren. <b>5 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren. Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.		
13.	Jeweils <b>150 µl HCL</b> in alle Kavitäten pipettieren.		
14.	Platte mit <b>FOIL</b> abdecken und für <b>10 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) schütteln.		
	<b>Überstand anschließend nicht verwerfen bzw. Platte nicht ausleeren!</b> Von den Überständen werden für den nachfolgenden RIA folgende Volumina benötigt:		
	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;"><b>Adrenalin</b> <b>100 µl</b></td> <td style="width: 50%; text-align: center;"><b>Noradrenalin</b> <b>20 µl</b></td> </tr> </table>	<b>Adrenalin</b> <b>100 µl</b>	<b>Noradrenalin</b> <b>20 µl</b>
<b>Adrenalin</b> <b>100 µl</b>	<b>Noradrenalin</b> <b>20 µl</b>		

## 6.3 Adrenalin RIA

1.	Jeweils <b>100 µl HCL</b> in die <b>Röhrchen</b> für die <b>NSB</b> pipettieren.
2.	Jeweils <b>100 µl</b> der <b>extrahierten Standards, Kontrollen</b> und <b>Proben</b> in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
3.	Jeweils <b>25 µl Enzymlösung</b> (siehe 6.1) in alle Röhrchen ( <b>außer Totalaktivität T</b> ) pipettieren.
4.	Röhrchen gut mischen und <b>30 Min</b> bei <b>37 °C</b> inkubieren.
5.	Je <b>50 µl <sup>125I</sup>ADR MN</b> in alle Röhrchen pipettieren.
6.	Je <b>50 µl AS ADR MN</b> in alle Röhrchen ( <b>außer Totalaktivität T und NSB</b> ) pipettieren.
7.	Röhrchen abdecken und <b>15 - 20 Stunden</b> (über Nacht) bei <b>2 – 8 °C</b> inkubieren. <b>Alternativ 2 Stunden</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.
8.	Das vorgekühlte (2 - 8 °C) <b>PREC-REAG</b> gründlich aufschütteln und jeweils <b>500 µl</b> in alle Röhrchen ( <b>außer Totalaktivität T</b> ) pipettieren. Kurz mischen.
9.	<b>15 Min</b> bei <b>2 - 8 °C</b> inkubieren.
10.	<b>15 Min</b> bei <b>3000 x g</b> - möglichst mit Kühlung - zentrifugieren.
11.	<b>Überstand</b> absaugen oder vorsichtig <b>dekantieren (außer Totalaktivität T)</b> . Röhrchen ausklopfen und für 2 Minuten umgedreht stehen lassen.
12.	Röhrchen <b>1 Minute</b> in einem Gamma-Counter <b>messen</b> .

## 6.4 Noradrenalin RIA

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

## 7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Adrenalin		Noradrenalin
	Urin	0,39 - 200 ng/ml	1,1 - 1000 ng/ml
	Plasma	19 - 6667 pg/ml	42 - 33 333 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 unbekanntes 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 **30 dividiert** werden.

### Umrechnung

Adrenalin (ng/ml)  $\times 5,46 =$  Adrenalin (nmol/l)

Noradrenalin (ng/ml)  $\times 5,91 =$  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

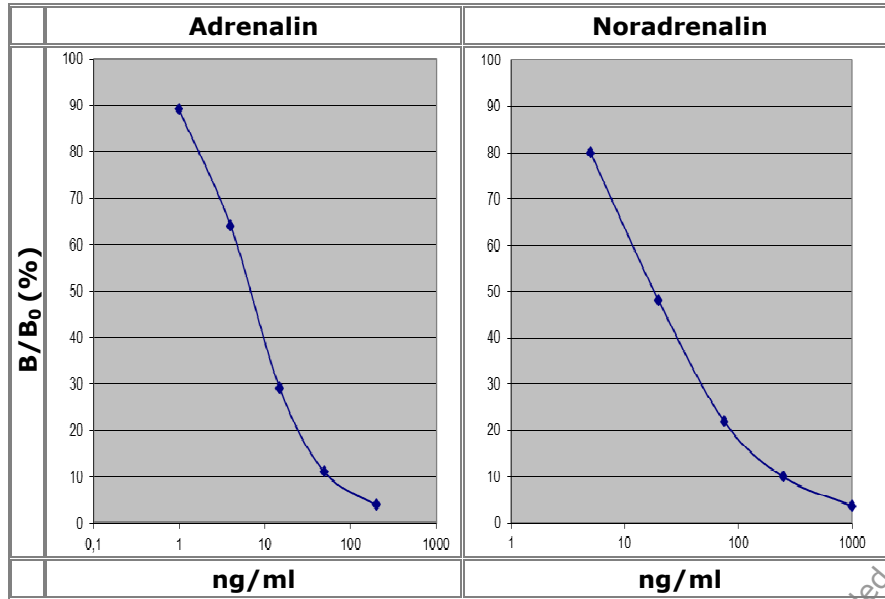
## 7.1 Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie die Kitkontrollen und andere kommerzielle Kontrollproben im physiologischen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Die Kontrollproben müssen innerhalb der angegebenen Vertrauensbereiche 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 (Limit of Detection)	Adrenalin		Noradrenalin	
	Urin	0,39 ng/ml	1,1 ng/ml	
	Plasma	19 pg/ml	42 pg/ml	

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	< 0,0007	< 0,01	
Phenylalanin, Coffeinsäure, L-Dopa, Homovanillinsäure, Tyrosin, 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure	< 0,01	< 0,01	

Präzision							
Intra-Assay Urin (n = 40)				Intra-Assay Plasma (n = 40)			
	Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)		Probe	Bereich (pg/ml)	CV (%)
Adrenalin	1	15,8 ± 1,1	7,0	Adrenalin	1	146 ± 17,4	12,0
	2	22,3 ± 1,7	7,4		2	389 ± 38,7	10,1
	3	45,2 ± 5,1	11,3		3	1271 ± 88,4	7,0
Noradrenalin	1	86,8 ± 6,8	7,8	Noradrenalin	1	992 ± 85,8	9,3
	2	122 ± 10,9	8,9		2	1811 ± 224	12,3
	3	244 ± 21,9	8,9		3	4935 ± 663	13,4



Inter-Assay Urin (n = 18)				Inter-Assay Plasma (n = 20)			
	Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)		Probe	Bereich (pg/ml)	CV (%)
Adrenalin	1	15,5 ± 1,5	9,5	Adrenalin	1	129 ± 12,7	9,8
	2	21,0 ± 2,5	11,7		2	347 ± 31,9	9,2
	3	42,7 ± 5,0	11,7		3	1139 ± 128	11,3
Noradrenalin	1	77,7 ± 8,5	10,9	Noradrenalin	1	754 ± 184	24,4
	2	104 ± 9,4	9,1		2	1661 ± 176	10,9
	3	198 ± 22,7	11,5		3	4049 ± 391	9,7

Linearität			Serielle Verdünnung bis:	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	Adrenalin	Urin	1:128	99 - 114	105
		Plasma	1:128	107 - 113	110
	Noradrenalin	Urin	1:128	93 - 106	98
Plasma		1:128	95 - 113	103	

Wiederfindung			Konzentrationsbereich	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	Adrenalin	Urin	5,2 - 48,8 ng/ml	101 - 111	105
		Plasma	25,3 - 1001 pg/ml	105 - 119	111
	Noradrenalin	Urin	62,9 - 292 ng/ml	99 - 107	102
Plasma		377 - 4457 pg/ml	80 - 101	92	

Methodenvergleich zur HPLC*	Adrenalin	Urin	HPLC = 0,95 RIA - 0,03	r = 0,99; n = 21
		Plasma	HPLC = 0,80 RIA - 0,03	r = 0,96; n = 20
	Noradrenalin	Urin	HPLC = 1,23 RIA - 0,12	r = 0,99; n = 21
		Plasma	HPLC = 1,27 RIA - 0,14	r = 0,99; 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	<b>LOT</b>	Chargennummer	<b>IVD</b>	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	<b>CONT</b>	Inhalt	<b>CE</b>	CE gekennzeichnet
	Achtung	<b>REF</b>	Katalog-Nummer	<b>RUO</b>	Nur für Forschungszwecke