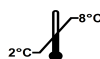


Instructions for use
3-CAT RIA Fast Track

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

REF**BA R-6600****IVD****CE****600 kBq**

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

¹²⁵I – Radioimmunoassay for the quantitative determination of Adrenaline (Epinephrine), Noradrenaline (Norepinephrine) and Dopamine in plasma and urine.

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

The 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 standard 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 Sheets (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

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:	3 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:	2 x 4 ml/vial, green cap	
BA R-0120	¹²⁵I ADR MN	¹²⁵I - Adrenaline - Ready to use
Content:	¹²⁵ I labeled Adrenaline, red coloured	
Volume:	1 x 5.5 ml/vial, blue cap	
Hazards identification:		
	Radioactive, activity < 200 kBq	

- BA R-0220** ¹²⁵I **NAD** **NMN** **¹²⁵I – Noradrenaline** - Ready to use
 Content: ¹²⁵I labeled Noradrenaline, red coloured
 Volume: 1 x 5.5 ml/vial, yellow cap
 Hazards identification: 
 Radioactive, activity < 200 kBq
- BA R-0320** ¹²⁵I **DOP** **¹²⁵I – Dopamine** - Ready to use
 Content: ¹²⁵I labeled Dopamine, red coloured
 Volume: 1 x 5.5 ml/vial, dark green cap
 Hazards identification: 
 Radioactive, activity < 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
- 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
- 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: 6 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

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/ Cap	Concentration ng/ml			Concentration nmol/l			Volume/ Vial
			ADR	NAD	DOP	ADR	NAD	DOP	
BA R-6601	STANDARD A	white	0	0	0	0	0	0	4 ml
BA R-6602	STANDARD B	light yellow	1	5	10	5.5	30	65	4 ml
BA R-6603	STANDARD C	orange	4	20	40	22	118	261	4 ml
BA R-6604	STANDARD D	dark blue	15	75	150	82	443	980	4 ml
BA R-6605	STANDARD E	light grey	50	250	500	273	1 478	3 265	4 ml
BA R-6606	STANDARD F	black	200	1 000	2 000	1 092	5 910	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	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!						4 ml

Conversion: Adrenaline (ng/ml) x 5.46 = Adrenaline (nmol/l)
 Noradrenaline (ng/ml) x 5.91 = Noradrenaline (nmol/l)
 Dopamine (ng/ml) x 6.53 = Dopamine (nmol/l)

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

*for the determination of dopamine in plasma the additional **Standard A/B** is mandatory!**4.2 Additional materials and equipment required but not provided in the kit**

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 - 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"> <tr> <td>Adrenaline</td> <td>100 µl</td> <td>Noradrenaline</td> <td>20 µl</td> </tr> <tr> <td>Dopamine (standards + urine)</td> <td>10 µl</td> <td>Dopamine (plasma)</td> <td>25 µl</td> </tr> </table>	Adrenaline	100 µl	Noradrenaline	20 µl	Dopamine (standards + urine)	10 µl	Dopamine (plasma)	25 µl
Adrenaline	100 µl	Noradrenaline	20 µl						
Dopamine (standards + urine)	10 µl	Dopamine (plasma)	25 µl						

6.3 Adrenaline RIA

1.	Pipette 100 µl of Hydrochloric Acid into the tubes for the NSB .
2.	Pipette 100 µl of the extracted standards, controls and 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 Adrenaline into all tubes .
6.	Pipette 50 µl of Adrenaline 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.

6.4 Noradrenaline RIA

1. Pipette 20 µl of Hydrochloric Acid into the tubes for the NSB .
2. Pipette 20 µl of the extracted standards, controls and 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 Noradrenaline into all tubes .
6. Pipette 50 µl of Noradrenaline Antiserum into all tubes (except totals and NSB) ; mix thoroughly.
7. Cover tubes. Incubate for 15 - 20 h (overnight) at 2 - 8 °C . <i>Alternatively incubate for 2 h at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).</i>
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.

6.5 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, 10 µl of the extracted 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 . <i>Alternatively incubate for 2 h at RT (20 - 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).</i>
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		Adrenaline	Noradrenaline	Dopamine
	Urine		0.39 - 200 ng/ml	1.1 - 1 000 ng/ml
Plasma		19 - 6 667 pg/ml	42 - 33 333 pg/ml	29 - 26 667 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: $\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$

Plasma samples

Adrenaline and Noradrenaline:

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

Dopamine:

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

Conversion

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

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

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

Expected reference values

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

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

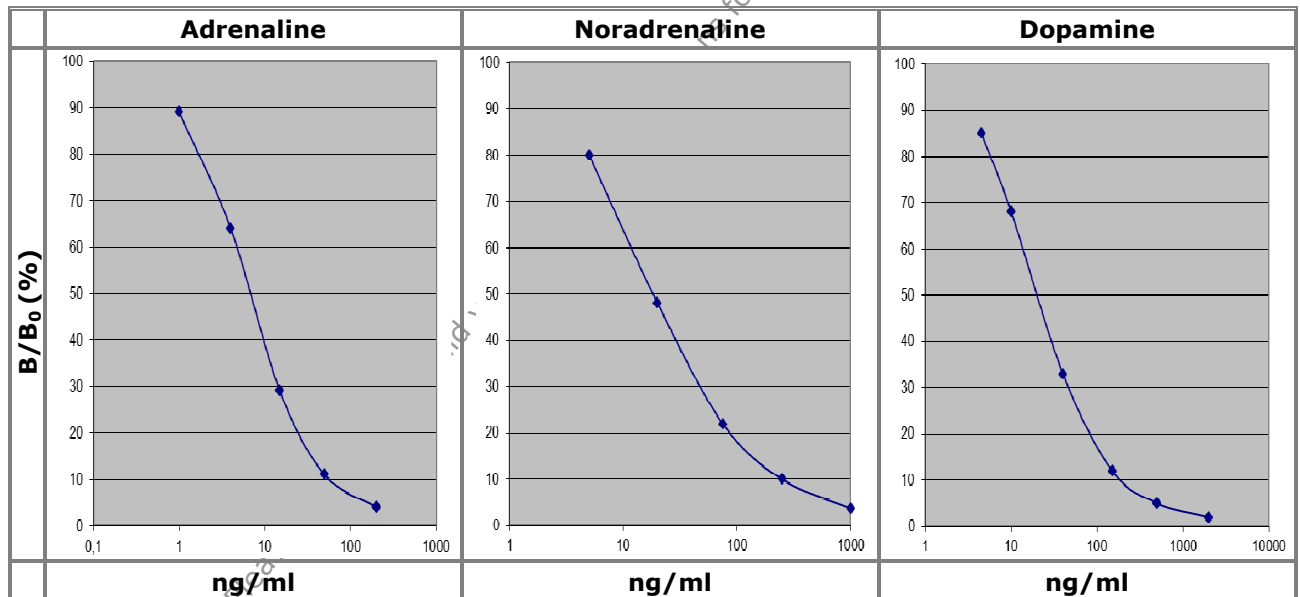
7.1 Quality control

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. The kit 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	Dopamine
	Urine	0.39 ng/ml	1.1 ng/ml	3.0 ng/ml
	Plasma	19 pg/ml	42 pg/ml	29 pg/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)		
		Adrenaline	Noradrenaline	Dopamine
	Derivatized Adrenaline	100	0.08	0.02
	Derivatized Noradrenaline	0.13	100	6.4
	Derivatized Dopamine	< 0.01	0.03	100
	Metanephrine	0.18	< 0.01	< 0.01
	Normetanephrine	< 0.01	0.16	0.01
	3-Methoxytyramine	< 0.01	< 0.01	0.49
	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol	<0.01	< 0.01	< 0.01
	Tyramine	< 0.0007	< 0.01	0.18
	Phenylalanine, Caffeinic acid, L-Dopa, Homovanillic acid, Tyrosine, 3-Methoxy-4-hydroxymandelic acid	< 0.01	< 0.01	< 0.01

Precision							
Intra-Assay Urine (n = 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
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	2 588 ± 742	24.0
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
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	2 216 ± 564	25.5

Linearity			Serial dilution up to	Range (%)	Mean (%)
			Adrenaline	Urine	1:128
	Adrenaline	Plasma	1:128	107 - 113	110
	Noradrenaline	Urine	1:128	93 - 106	98
	Noradrenaline	Plasma	1:128	95 - 113	103
	Dopamine	Urine	1:128	90 - 121	105
	Dopamine	Plasma	1:128	67 - 90	83

Recovery			Concentration range	Range (%)	Mean (%)
			Adrenaline	Urine	5.2 - 48.8 ng/ml
	Adrenaline	Plasma	25.3 - 1 001 pg/ml	105 - 119	111
	Noradrenaline	Urine	62.9 - 292 ng/ml	99 - 107	102
	Noradrenaline	Plasma	377 - 4 457 pg/ml	80 - 101	92
	Dopamine	Urine	137 - 1 823 ng/ml	79 - 126	110
	Dopamine	Plasma	20.3 - 5 158 pg/ml	74 - 94	85

Method Comparison versus HPLC*	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
	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
	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) Kvetnansky et al. Stress Stimulates Production of Catecholamines in Rat Adipocytes. Cellular and Molecular Neurobiology, 32(5):801-813 (2012)
- (2) Wetsch et al. Preoperative stress and anxiety in day-care patients and inpatients undergoing fast-track surgery. British Journal of Anaesthesia, 103 (2):199-205 (2009)
- (3) Mahapatra et al. The chromogranin A fragment catestatin: specificity, potency and mechanism to inhibit exocytotic secretion of multiple catecholamine storage vesicle co-transmitters. Journal of Hypertension, 24(5):895-904 (2006)

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

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

Symbols:

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

1. Einleitung**1.1 Verwendungszweck und Testprinzip**

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

Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin 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 Funktionstests 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) 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 (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).
- (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 Sicherheitsdatenblatt (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:	3 x 55 ml/ Fläschchen, Deckel weiß	
BA R-0050	ADJUST-BUFF	Adjustment Buffer - Gebrauchsfertig
Inhalt:	TRIS Puffer	
Volumen:	2 x 4 ml/Fläschchen, Deckel grün	

- BA R-0120** ¹²⁵I ADR MN **¹²⁵I – Adrenaline** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: ¹²⁵I markiertes Adrenalin, rot gefärbt
 Volumen: 1 x 5,5 ml/ Fläschchen, Deckel blau
 Mögliche Gefahren: 
 Radioaktiv, Aktivität < 200 kBq
- BA R-0220** ¹²⁵I NAD NMN **¹²⁵I – Noradrenaline** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: ¹²⁵I markiertes Noradrenalin, rot gefärbt
 Volumen: 1 x 5,5 ml/ Fläschchen, Deckel gelb
 Mögliche Gefahren: 
 Radioaktiv, Aktivität < 200 kBq
- 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-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-6310** AS DOP **Dopamine Antiserum** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Kaninchen Anti- Dopamin Antikörper, grün gefärbt
 Volumen: 1 x 5,25 ml/Fläschchen, Deckel dunkelgrün
- 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.
- 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: 6 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

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckel-farbe	Konzentration ng/ml			Konzentration nmol/l			Volumen/ Fläschchen
			ADR	NAD	DOP	ADR	NAD	DOP	
BA R-6601	STANDARD A	weiß	0	0	0	0	0	0	4 ml
BA R-6602	STANDARD B	hellgelb	1	5	10	5.5	30	65	4 ml
BA R-6603	STANDARD C	orange	4	20	40	22	118	261	4 ml
BA R-6604	STANDARD D	dunkelblau	15	75	150	82	443	980	4 ml
BA R-6605	STANDARD E	hellgrau	50	250	500	273	1478	3265	4 ml
BA R-6606	STANDARD F	schwarz	200	1000	2000	1092	5910	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 auf dem QC Report						4 ml

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

Noradrenalin (ng/ml) x 5,91 = Noradrenalin (nmol/l)

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

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

*Zur Bestimmung des Dopamins im Plasma muss der zusätzliche **Standard A/B** verwendet werden!**4.2 Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien**

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 - 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 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 hergestellt werden! Nach Gebrauch verwerfen!*

6.2 Probenvorbereitung, Extraktion und Azylierung

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

- Jeweils **10 µl** der **Standards, Kontrollen, Urinproben** und **300 µl** der **Plasmaproben** in die entsprechenden Kavitäten der **EXTRACT-PLATE 48** pipettieren.
- Jeweils **250 µl Wasser** (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) zu den **Standards, Kontrollen** und **Urinproben** hinzugeben.
- Je **50 µl ASSAY-BUFF** in alle Kavitäten pipettieren.
- Je **50 µl EXTRACT-BUFF** in alle Kavitäten pipettieren.
- Platte mit **FOIL** abdecken und für **30 Min** bei **RT** (20 - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
- FOIL** entfernen. Die Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
- 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.
- Jeweils **150 µl ACYL-BUFF** in alle Kavitäten pipettieren.
- Jeweils **25 µl ACYL-REAG** in alle Kavitäten pipettieren.
- 15 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.
- 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.
- Jeweils **150 µl HCL** in alle Kavitäten pipettieren.
- 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:

Adrenalin	100 µl	Noradrenalin	20 µl
Dopamin (Standards + Urin)	10 µl	Dopamin (Plasma)	25 µl


6.3 Adrenalin RIA

1.	Jeweils 100 µl [HCL] in die Röhrchen für die NSB pipettieren.
2.	Jeweils 100 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
3.	Jeweils 25 µl Enzymlösung (siehe 6.1) alle Röhrchen (außer Totalaktivität T) pipettieren.
4.	Röhrchen gut mischen und 30 Min bei 37 °C inkubieren.
5.	Je 50 µl [^{125I}ADR]MN in alle Röhrchen pipettieren.
6.	Je 50 µl [AS]ADR MN 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 oder vorsichtig dekantieren (außer Totalaktivität T) . Röhrchen ausklopfen und für 2 Minuten umgedreht stehen lassen.
12.	Röhrchen 1 Minute in einem Gamma-Counter messen .

6.4 Noradrenalin RIA

1.	Jeweils 20 µl [HCL] in die Röhrchen für die NSB pipettieren.
2.	Jeweils 20 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
3.	Jeweils 25 µl Enzymlösung (siehe 6.1) alle Röhrchen (außer Totalaktivität T) pipettieren.
4.	Röhrchen gut mischen und 30 Min bei 37 °C inkubieren.
5.	Je 50 µl [^{125I}NAD]NMN in alle Röhrchen pipettieren.
6.	Je 50 µl [AS]NAD 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 oder vorsichtig dekantieren (außer Totalaktivität T) . Röhrchen ausklopfen und für 2 Minuten umgedreht stehen lassen.
12.	Röhrchen 1 Minute in einem Gamma-Counter messen .

6.5 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, 10 µl der extrahierten 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) 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		Adrenalin	Noradrenalin	Dopamin
	Urin		0,39 - 200 ng/ml	1,1 - 1000 ng/ml
Plasma		19 - 6667 pg/ml	42 - 33333 pg/ml	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

Adrenalin und Noradrenalin:

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

Dopamin:

Die aus der Kurve abgelesenen Konzentrationen müssen durch **75 dividiert** werden.

Umrechnung

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

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

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

Erwartete Referenzwerte

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

	Adrenalin	Noradrenalin	Dopamin
Sammelurin	< 20 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ (110 nmol/Tag)	< 90 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ (535 nmol/Tag)	< 600 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ (3900 nmol/Tag)
Plasma	< 100 pg/ml	< 600 pg/ml	< 100 pg/ml

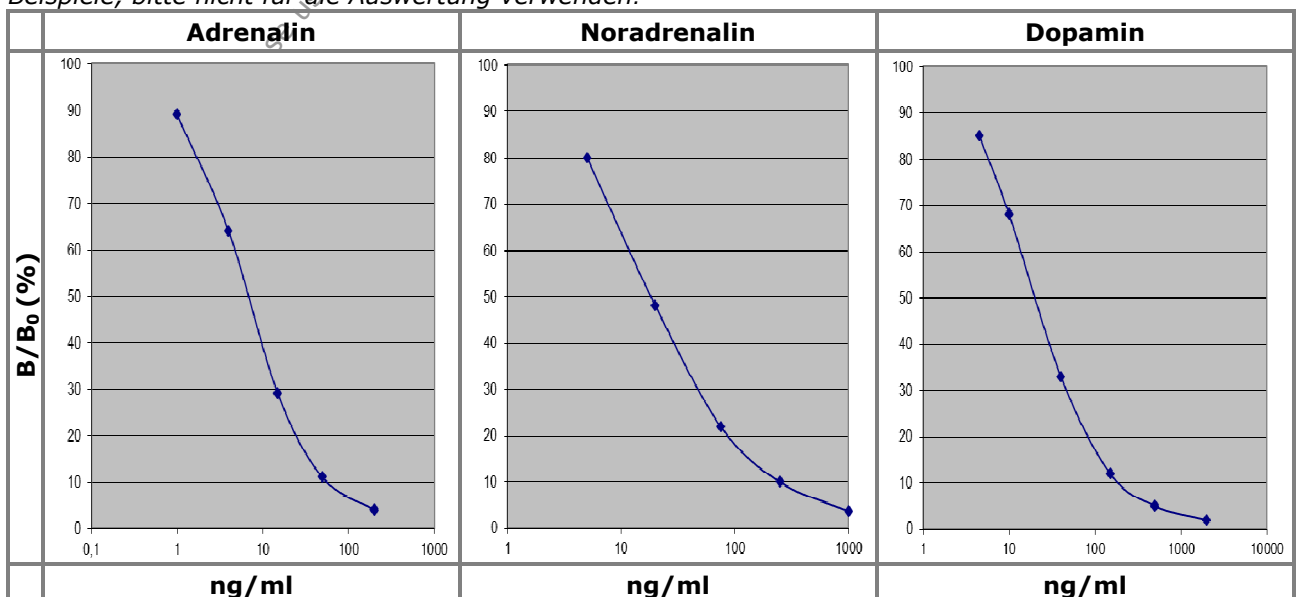
7.1 Qualitätskontrolle

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. 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	Dopamine
	Urin	0,39 ng/ml	1,1 ng/ml	3,0 ng/ml
	Plasma	19 pg/ml	42 pg/ml	29 pg/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktion)	Substanz	Kreuzreaktion (%)		
		Adrenalin	Noradrenalin	Dopamin
	Derivatisiertes Adrenalin	100	0,08	0,02
	Derivatisiertes Noradrenalin	0,13	100	6,4
	Derivatisiertes Dopamin	< 0,01	0,03	100
	Metanephrin	0,18	< 0,01	< 0,01
	Normetanephrin	< 0,01	0,16	0,01
	3-Methoxytyramin	< 0,01	< 0,01	0,49
	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Tyramin	< 0,0007	< 0,01	0,18	
Phenylalanin, Coffeinsäure, L-Dopa, Homovanillinsäure, Tyrosin, 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure	< 0,01	< 0,01	< 0,01	

Präzision							
Intra-Assay Urin (n = 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
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 (%)
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
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 (%)
	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
	Dopamin	Urin	1:128	90 - 121	105
Plasma		1:128	67 - 90	83	


			Konzentrationsbereich	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	Wiederfindung	Adrenalin	Urin	5,2 - 48,8 ng/ml	101 - 111
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
Dopamin		Urin	137 - 1823 ng/ml	79 - 126	110
		Plasma	20,3 - 5158 pg/ml	74 - 94	85

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
	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) Kvetnansky et al. Stress Stimulates Production of Catecholamines in Rat Adipocytes. Cellular and Molecular Neurobiology, 32(5):801-813 (2012)
- (2) Wetsch et al. Preoperative stress and anxiety in day-care patients and inpatients undergoing fast-track surgery. British Journal of Anaesthesia, 103 (2):199-205 (2009)
- (3) Mahapatra et al. The chromogranin A fragment catestatin: specificity, potency and mechanism to inhibit exocytotic secretion of multiple catecholamine storage vesicle co-transmitters. Journal of Hypertension, 24(5):895-904 (2006)

 **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