

---

**Instructions for use**  
**2-CAT Plasma ELISA**

**REF**

**DEE4500**

  
2 x 96

  
+2 / +8 °C

**IVD**

**CE**

## **1. Introduction**

### **1.1 Intended use and principle of the test**

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

Adrenaline (epinephrine) and noradrenaline (norepinephrine) are extracted from a plasma sample\*) by using a cis-diol-specific affinity gel, acylated and then modified enzymatically.

The competitive ELISA kit uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The derivatized standards, controls and samples and the solid phase bound analytes compete for a fixed number of antibody binding sites. After the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antibody complexes are removed by washing. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate. The reaction is monitored at 450 nm.

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

\*) Flexible sample volumes between 100 – 600 µl can be used with this assay.

### **1.2 Clinical application**

In humans the catecholamines adrenaline (epinephrine), noradrenaline (norepinephrine) and dopamine are neurotransmitter 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 sympathicoadrenal system like the pheochromocytomas. The quantitative determination of catecholamines in urine is preferred for the diagnosis of these tumors, whereas the determination of catecholamines in plasma is medically sensible for the localization of the tumor and for function testing. Values above the cut-off can provide an indication for neuroendocrine tumors.

However, in literature various diseases like hypertension, cardiovascular diseases, schizophrenia and manic depression are described with 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 Procedural cautions, guidelines and warnings**

- (1) This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and has to be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for certain types of samples as indicated in *Intended Use* (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) Reagents of this kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- (4) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (5) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled or ultra-pure water.
- (8) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided.

- (9) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (10) 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.
- (11) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (12) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (13) A standard curve must be established for each run.
- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (17) Some reagents contain sodium azide (NaN<sub>3</sub>) as preservatives. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water. NaN<sub>3</sub> may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. When disposing reagents, flush with a large volume of water to avoid azide build-up.
- (18) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them.
- (19) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheet (MSDS). The Material Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (20) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (21) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
- (22) 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.

### 2.2.2 Drug interferences

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

### 2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

## 3. Storage and stability

Store the unopened reagents at 2 - 8 °C until expiration date. Do not use components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened the reagents are stable for 1 month when stored at 2 - 8 °C. Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly with desiccant again.

## 4. Materials

### 4.1 Contents of the kit

<b>BA D-0090</b>	<b>FOILS</b>	<b>Adhesive Foil</b> - Ready to use
Contents:	Adhesive Foils in a resealable pouch	
Volume:	2 x 4 foils	
<b>BA E-0030</b>	<b>WASH-CONC 50x</b>	<b>Wash Buffer Concentrate</b> - Concentrated 50x
Contents:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	2 x 20 ml/vial, light purple cap	
<b>BA R-6618</b>	<b>EXTRACT-PLATE 48</b>	<b>Extraction Plate</b> - Ready to use
Contents:	2 x 48 well plates coated with boronate affinity gel in a resealable pouch	

- BA E-0040** **CONJUGATE** **Enzyme Conjugate** - Ready to use  
 Contents: Goat anti-rabbit immunoglobulins, conjugated with peroxidase  
 Volume: 2 x 12 ml/vial, red cap
- BA E-0055** **SUBSTRATE** **Substrate** - Ready to use  
 Contents: Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide  
 Volume: 2 x 12 ml/black vial, black cap
- BA E-0080** **STOP-SOLN** **Stop Solution** - Ready to use  
 Contents: 0.25 M sulfuric acid  
 Volume: 2 x 12 ml/vial, light grey cap
- BA E-0131** **ADR MN** **Adrenaline Microtiter Strips** - Ready to use  
 Contents: 1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable blue foil pouch with desiccant, blue coloured
- BA E-0231** **NAD MNM** **Noradrenaline Microtiter Strips** - Ready to use  
 Contents: 1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable yellow foil pouch with desiccant, yellow coloured
- BA E-4110** **ADR-AS** **Adrenaline Antiserum** - Ready to use  
 Contents: Rabbit anti-adrenaline antibody, blue coloured  
 Volume: 1 x 6 ml/vial, blue cap
- BA E-4210** **NAD-AS** **Noradrenaline Antiserum** - Ready to use  
 Contents: Rabbit anti-noradrenaline antibody, yellow coloured  
 Volume: 1 x 6 ml/vial, yellow cap

**Standards and Controls** - Ready to use


Cat. no.	Component	Colour/ Cap	Concentration pg/ml		Concentration pmol/l		Volume/ Vial
			ADR	NAD	ADR	NAD	
<b>BA R-4601</b>	STANDARD A	white	0	0	0	0	4 ml
<b>BA R-4602</b>	STANDARD B	light yellow	20	80	109	473	4 ml
<b>BA R-4603</b>	STANDARD C	orange	60	240	328	1 418	4 ml
<b>BA R-4604</b>	STANDARD D	dark blue	200	800	1 092	4 728	4 ml
<b>BA R-4605</b>	STANDARD E	light grey	800	3 200	4 368	18 912	4 ml
<b>BA R-4606</b>	STANDARD F	black	3 200	12 800	17 472	75 648	4 ml
<b>BA R-4651</b>	CONTROL 1	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!				4 ml
<b>BA R-4652</b>	CONTROL 2	dark red					4 ml

Conversion: Adrenaline (pg/ml) x 5.46 = Adrenaline (pmol/l)  
 Noradrenaline (pg/ml) x 5.91 = Noradrenaline (pmol/l)

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

- BA R-0050** **ADJUST-BUFF** **Adjustment Buffer** - Ready to use  
 Contents: TRIS buffer  
 Volume: 1 x 4 ml/vial, green cap

- BA D-0032** **96** **Microtiter Plate** - Ready to use  
 Contents: 1 x 96 wells, empty in a resealable pouch

- BA R-4617** TE-BUFF **TE Buffer** - Ready to use  
 Contents: TRIS-EDTA buffer  
 Volume: 1 x 4 ml/vial, brown cap
- BA R-6611** ACYL-BUFF **Acylation Buffer** - Ready to use  
 Contents: Buffer with light alkaline pH for the acylation  
 Volume: 1 x 20 ml/vial, white cap
- BA R-6612** ACYL-REAG **Acylation Reagent** - Ready to use  
 Contents: 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  
 Contents: S-adenosyl-L-methionine  
 Volume: 1 x 4 ml/vial, purple cap
- BA R-6615** ENZYME **Enzyme** - Lyophilized  
 Contents: Catechol-O-methyltransferase  
 Volume: 4 vials, pink cap
- BA R-6619** HCL **Hydrochloric Acid** - Ready to use  
 Contents: 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 25 – 700 µl; 1 ml
- Microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 – 650 nm
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Temperature controlled incubator (37 °C) or similar heating device
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled or ultra-pure)
- Vortex mixer

#### 5. Sample collection and storage

##### Plasma

Whole blood should be collected by venipuncture into centrifuge tubes containing EDTA as anti-coagulant (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.

#### 6. Test procedure

A plasma volume between **100 µl-600 µl** is needed per single determination.

If a plasma volume **< 600 µl** is used, water (deionized, distilled or ultra-pure) has to be added to a **final volume of 600 µl** and this **prediluted sample** has to be used for the extraction procedure (please refer to point 6.2 of this protocol).

This sample predilution has to be considered in the calculation of results (please refer to point 7 of this protocol).

Allow all reagents to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Duplicate determinations are recommended.

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent, and the extinction values may vary if a thermostat is not used. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. Corresponding variations also apply to the incubation times. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20 – 25 °C.



*In case of overflow, read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 405 nm*

## 6.1 Preparation of reagents

### Wash Buffer

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

Storage: 1 month at 2 – 8 °C

### Enzyme Solution

Reconstitute the content of the vial labelled 'Enzyme' with 1 ml water (deionized, distilled or ultra-pure) and mix thoroughly. Add 0.3 ml of Coenzyme followed by 0.7 ml of Adjustment Buffer. The total volume of the Enzyme Solution is 2.0 ml.



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


## 6.2 Sample preparation, extraction and acylation

1.	Pipette <b>30 µl</b> of <b>standards, controls</b> and <b>600 µl</b> of <b>plasma samples</b> into the respective wells of the <b>Extraction Plate</b> .
2.	Add <b>500 µl</b> of <b>water</b> (deionized, distilled or ultra-pure) to the wells with <b>standards</b> and <b>controls</b> .
3.	Pipette <b>25 µl</b> of <b>TE Buffer</b> into all wells.
4.	Cover the plate with <b>Adhesive Foil</b> . Incubate <b>60 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
5.	Remove the foil and empty the plate. Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
6.	Pipette <b>1 ml</b> of <b>Wash Buffer</b> into all wells.
7.	Incubate <b>5 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
8.	Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
9.	<b>Wash one more time</b> as described (step 6, 7 and 8)!
10.	Pipette <b>150 µl</b> of <b>Acylation Buffer</b> into all wells.
11.	Pipette <b>25 µl</b> of <b>Acylation Reagent</b> into all wells.
12.	Incubate <b>20 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
13.	Empty the plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
14.	Pipette <b>1 ml</b> of <b>Wash Buffer</b> into all wells.
15.	Incubate <b>5 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
16.	Blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
17.	<b>Wash one more time</b> as described (step 14, 15, 16).
18.	Pipette <b>200 µl</b> of <b>Hydrochloric Acid</b> into all wells.
19.	Cover plate with <b>Adhesive Foil</b> . Incubate <b>10 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
	<b>Do not decant the supernatant thereafter!</b>
	<b>190 µl of the supernatant is needed for the subsequent enzymatic conversion</b>


### 6.3 Enzymatic conversion

1.	Pipette <b>190 µl</b> of the <b>extracted standards, controls</b> and <b>samples</b> into the respective wells of the <b>Microtiter Plate</b> .				
2.	Add <b>50 µl</b> of <b>Enzyme Solution</b> (refer to 6.1) to all wells.				
3.	Cover plate with <b>Adhesive Foil</b> . Incubate <b>1 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).				
4.	Incubate for <b>2 h</b> at <b>37°C</b> . The following volumes of the supernatants are needed for the subsequent ELISA: <table border="1" data-bbox="199 403 1029 448"><tr><td><b>Adrenaline</b></td><td><b>100 µl</b></td><td><b>Noradrenaline</b></td><td><b>10 µl</b></td></tr></table>	<b>Adrenaline</b>	<b>100 µl</b>	<b>Noradrenaline</b>	<b>10 µl</b>
<b>Adrenaline</b>	<b>100 µl</b>	<b>Noradrenaline</b>	<b>10 µl</b>		

### 6.4 Adrenaline ELISA

1.	Pipette <b>100 µl</b> of <b>standards, controls</b> and <b>samples</b> from the <b>Enzyme Plate</b> (refer to 6.3) into the respective pre-coated <b>Adrenaline Microtiter Strips</b> .
2.	Pipette <b>50 µl</b> of the respective <b>Adrenaline Antiserum</b> into all wells.
3.	Cover the plate with <b>Adhesive Foil</b> . Incubate <b>1 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
4.	Incubate for <b>15 – 20 h</b> (overnight) at <b>2 – 8 °C</b> .
5.	Remove the foil. Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate <b>4 x</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash Buffer</b> , <b>discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.
6.	Pipette <b>100 µl</b> of <b>Enzyme Conjugate</b> into all wells.
7.	Cover the plate with <b>Adhesive Foil</b> . Incubate <b>30 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
8.	Remove the foil. Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate <b>4 x</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash Buffer</b> , <b>discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.
9.	Pipette <b>100 µl</b> of <b>Substrate</b> into all wells.
10.	Incubate <b>20 - 30 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).  <b>Avoid exposure to direct sunlight!</b>
11.	Pipette <b>100 µl</b> of <b>Stop Solution</b> into all wells.
12.	<b>Read</b> the <b>absorbance</b> of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to <b>450 nm</b> (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

### 6.5 Noradrenaline ELISA

1.	Pipette <b>10 µl</b> of <b>standards, controls</b> and <b>samples</b> from the <b>Enzyme Plate</b> (refer to 6.3) into the respective pre-coated <b>Noradrenaline Microtiter Strips</b> .
2.	Pipette <b>50 µl</b> of the respective <b>Noradrenaline Antiserum</b> into all wells.
3.	Cover the plate with <b>Adhesive Foil</b> . Incubate <b>1 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
4.	Incubate for <b>15 – 20 h</b> (overnight) at <b>2 – 8 °C</b> .
5.	Remove the foil. Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate <b>4 x</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash Buffer</b> , <b>discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.
6.	Pipette <b>100 µl</b> of <b>Enzyme Conjugate</b> into all wells.
7.	Cover the plate with <b>Adhesive Foil</b> . Incubate <b>30 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
8.	Remove the foil. Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate <b>4 x</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash Buffer</b> , <b>discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.
9.	Pipette <b>100 µl</b> of <b>Substrate</b> into all wells.
10.	Incubate <b>20 - 30 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).  <b>Avoid exposure to direct sunlight!</b>
11.	Pipette <b>100 µl</b> of <b>Stop Solution</b> into all wells.
12.	<b>Read</b> the <b>absorbance</b> of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to <b>450 nm</b> (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

## 7. Calculation of results

Measuring range	Adrenaline	Noradrenaline
	10 – 3 200 pg/ml	20 – 12 800 pg/ml

The calibration curves are obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis). Use a non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).

The concentrations of the **undiluted plasma samples** and the **controls** can be read directly from the standard curve.

### Concentration of diluted plasma samples:

If only a plasma volume **< 600 µl** was used for the extraction, the concentration read from the standard curve has to be **multiplied** with a **volume-factor**:

$$\text{Volume-factor} = \frac{600 \mu\text{l}}{\text{used plasma volume } (\mu\text{l})}$$

### Conversion

Adrenaline (pg/ml) x 5.46 = Adrenaline (pmol/l)

Noradrenaline (pg/ml) x 5.91 = Noradrenaline (pmol/l)

### Expected reference values

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

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the 2-CAT Plasma ELISA <sup>High Sensitive</sup> the following values are observed:

Expected Reference Values	Adrenaline	Noradrenaline
	< 100 pg/ml	< 600 pg/ml

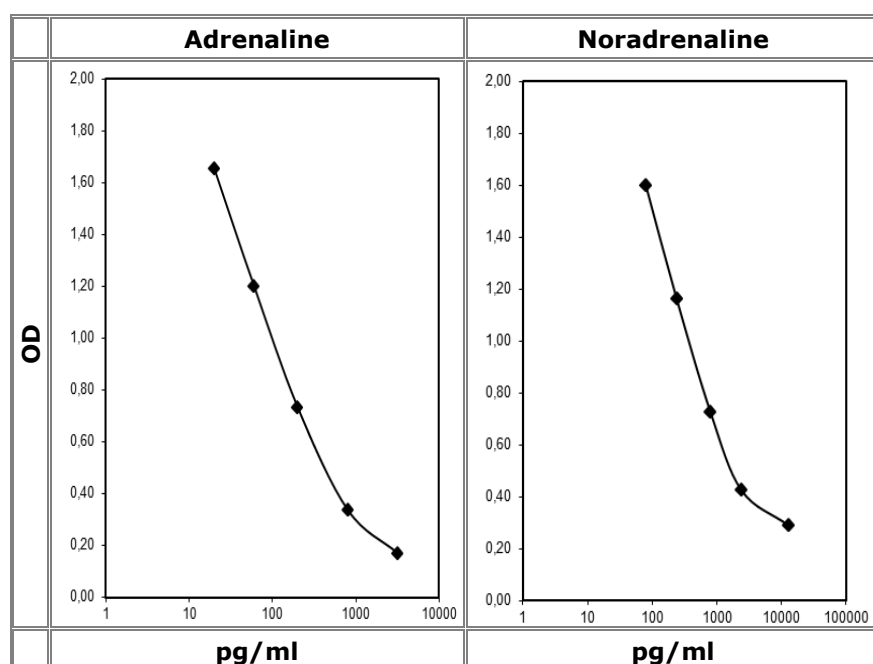
### 7.1 Quality control

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 indicated on the QC-Report.

### 7.2 Typical standard curves



*Examples, do not use for calculation!*





## 8. Assay characteristics

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)	
		Adrenaline	Noradrenaline
	Derivatized Adrenaline	100	0.14
	Derivatized Noradrenaline	0.20	100
	Derivatized Dopamine	< 0.01	0.2
	Metanephrine	0.64	< 0.01
	Normetanephrine	< 0.01	0.48
	3-Methoxytyramine	< 0.01	< 0.01
	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol	0.03	0.01
	Tyramine	< 0.01	< 0.01
	Phenylalanine, Caffeinic acid, L-Dopa, Homovanillic acid, Tyrosine, 3-Methoxy-4-hydroxymandelic acid	< 0.01	< 0.01

Analytical Sensitivity (600 µl undiluted sample) Limit of Detection	Adrenaline	Noradrenaline
	5.2 pg/ml	20 pg/ml

Precision				
Intra-Assay CV				
	Sample	Mean (pg/ml)	SD (pg/ml)	CV (%)
Adrenaline	low	54.0	9.1	16.8
	medium	113	13.2	11.7
	high	447	48.2	10.8
Noradrenaline	low	535	59.9	11.2
	medium	679	75.9	11.2
	high	2123	344	16.2

Recovery	Mean (%)	Range (%)	Measurement Range (pg/ml)
Adrenaline	110	93 - 121	38.9 - 2669
Noradrenaline	96	81 - 112	614 - 9606







Linearity		Serial dilution up to	Mean (%)	Range (%)
	Adrenaline	1:512	90	73 - 105
	Noradrenaline	1:512	96	76 - 107

## 9. References/Literature

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

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

**Symbols:**

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

## 1. Einleitung

### 1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin in Plasma.

Adrenalin und Noradrenalin werden mittels eines cis-diolspezifischen Boronat-Affinitätsgels aus der Plasmaprobe<sup>\*)</sup> extrahiert, danach azyliert und anschließend enzymatisch derivatisiert.

Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an eine feste Phase gebunden. Die derivatisierten Analyte der Standards, Kontrollen und Proben und die an die Festphase gebundenen Antigene konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die ungebundenen Antigene und Antigen-Antikörper-Komplexe durch Waschen entfernt. Der an die Festphase gebundene Antigen-Antikörper-Komplex wird mit einem enzymmarkierten Antikörper komplexiert und anschließend mit einem Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der unbekanntenen Proben wird mit Hilfe einer Standardkurve und Abgleich der gemessenen Absorption ermittelt.

<sup>\*)</sup> In diesem Assay können flexible Probevolumina zwischen 100 – 600 µl eingesetzt werden.

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

Des Weiteren werden in der Literatur noch zahlreiche Krankheitsbilder wie z.B. Hypertonie, degenerative 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 humanes Serum oder Plasma enthaltenden Reagenzien des Kits wurden mit geprüften Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Dennoch sollten sämtliche Reagenzien bei der Handhabung und Entsorgung als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandelt werden.
- (4) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (5) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.

- (8) Die Mikrotiterplatte verfügt über abbrechbare Streifen. Ungenutzte Kavitäten müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
- (9) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (10) 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.
- (11) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Kavitäten sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (12) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (13) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (14) 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.
- (15) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (16) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (17) Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) als Konservierungsmittel. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen. NaN<sub>3</sub> kann mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung der Reagenzien mit reichlich Wasser spülen, um die Ansammlung von Azid zu vermeiden.
- (18) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (19) 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.
- (20) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.
- (21) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.
- (22) 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.

### 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. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

## 4. Materialien

### 4.1 Reagenzien im Kit

- BA D-0090** FOILS **Adhesive Foil** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: 4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel  
Volumen: 2 x 4 Folien
- BA D-0032** 96 **Microtiter Plate** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: 1 x 96 Wells, leer in einem wiederverschließbaren Beutel
- BA E-0030** WASH-CONC 50x **Wash Buffer Concentrate** - 50x konzentriert  
Inhalt: Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH  
Volumen: 2 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila
- BA E-0040** CONJUGATE **Enzyme Conjugate** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: Ziege Anti-Kaninchen Immunoglobulin konjugiert mit Peroxidase  
Volumen: 2 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel rot
- BA E-0055** SUBSTRATE **Substrate** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: Chromogenes Substrate mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid  
Volumen: 2 x 12 ml/ Fläschchen schwarz, Deckel schwarz
- BA E-0080** STOP-SOLN **Stop Solution** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: 0,25 M Schwefelsäure  
Volumen: 2 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel hellgrau
- BA E-0131** ADR MN **Adrenaline Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem blauen widerverschließbaren Folienbeutel, blau gefärbt
- BA E-0231** NAD NMN **Noradrenaline Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem gelben widerverschließbaren Folienbeutel, gelb gefärbt
- BA E-4110** ADR-AS **Adrenaline Antiserum** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: Kaninchen Anti-Adrenalin Antikörper, blau gefärbt  
Volumen: 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau
- BA E-4210** NAD-AS **Noradrenaline Antiserum** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: Kaninchen Anti-Noradrenalin Antikörper, gelb gefärbt  
Volumen: 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel gelb
- BA R-0050** ADJUST-BUFF **Adjustment Buffer** - Gebrauchsfertig  
Inhalt: TRIS Puffer zur pH-Wert Einstellung  
Volumen: 1 x 4 ml/ Fläschchen, Deckel grün

**Standards und Controls** - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckel-farbe	Konzentration pg/ml		Konzentration pmol/l		Volumen/ Fläschchen
			ADR	NAD	ADR	NAD	
<b>BA R-4601</b>	STANDARD A	weiß	0	0	0	0	4 ml
<b>BA R-4602</b>	STANDARD B	hellgelb	20	80	109	473	4 ml
<b>BA R-4603</b>	STANDARD C	orange	60	240	328	1418	4 ml
<b>BA R-4604</b>	STANDARD D	dunkelblau	200	800	1092	4728	4 ml
<b>BA R-4605</b>	STANDARD E	hellgrau	800	3200	4368	18912	4 ml
<b>BA R-4606</b>	STANDARD F	schwarz	3200	12800	17472	75648	4 ml
<b>BA R-4651</b>	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und				4 ml
<b>BA R-4652</b>	CONTROL 2	dunkelrot	Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.				4 ml

Umrechnung: Adrenalin (pg/ml) x 5,46 = Adrenalin (pmol/l)  
Noradrenalin (pg/ml) x 5,91 = Noradrenalin (pmol/l)

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

**BA R-4617** TE-BUFF **TE Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: TRIS-EDTA Puffer

Volumen: 1 x 4 ml/ Fläschchen, Deckel braun

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

Inhalt: Leicht basischer Puffer zur Azylierung mit quecksilberfreien Stabilisatoren

Volumen: 1 x 20 ml/ Fläschchen, Deckel weiß

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

Inhalt: Azylierungsreagenz in DMF und DMSO

Volumen: 1 x 3 ml/ Fläschchen, Deckel hellrot

Mögliche Gefahren:



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

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

Inhalt: S-adenosyl-L-methionine

Volumen: 1 x 4 ml/ Fläschchen, Deckel lila

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

Inhalt: Catechol-O-methyltransferase

Volumen: 4 Fläschchen, Deckel hellrosa

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

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

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

Inhalt: 0,025 M Salzsäure, gelb gefärbt

Volumen: 1 x 20 ml/ Fläschchen, Deckel dunkelgrün

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

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 25 – 700 µl; 1 ml
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 - 650 nm-Filter
- Vortex-Mischer
- Wärmeschrank (37 °C) oder ähnliche Heizvorrichtung
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

## 5. Probenmaterial und Lagerung

### Plasma

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

Hämolytische und insbesondere lipämische Proben sollten nicht verwendet werden.

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

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

## 6. Testdurchführung


Für jede Einzelbestimmung wird ein Plasmavolumen von **100 µl - 600 µl** benötigt.

Falls ein Plasmavolumen von **< 600 µl** eingesetzt wird, die Probe mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein **Gesamtvolumen von 600 µl** auffüllen. Diese **vorverdünnte Probe** muss bei der Extraktion (siehe Punkt 6.2) eingesetzt werden.

Die Vorverdünnung der Probe muss bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden (siehe Punkt 7).

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

Die Reaktion des Antikörpers, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig und sollten durch ein Thermostat sichergestellt sein. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassay ist zwischen 20 – 25 °C.

 *Liegt die gemessene Absorption außerhalb des Messbereichs, so muss diese innerhalb von 10 Minuten nochmals bei 405 nm gemessen werden.*

### 6.1 Vorbereitung der Reagenzien


#### Waschpuffer

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

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 °C.

#### Enzymlösung

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

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

## 6.2 Probenvorbereitung, Extraktion und Azylierung


1. Jeweils <b>30 µl Standards, Kontrollen</b> und <b>600 µl Plasmaproben</b> in die entsprechenden Kavitäten der <b>EXTRACT-PLATE 48</b> pipettieren.
2. <b>500 µl Wasser</b> (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) zu den <b>Standards</b> und <b>Kontrollen</b> hinzugeben.
3. Je <b>25 µl TE-BUFF</b> in alle Kavitäten pipettieren.
4. <b>EXTRACT-PLATE 48</b> mit <b>FOIL</b> abdecken und für <b>60 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.
5. <b>FOIL</b> entfernen. Die <b>EXTRACT-PLATE 48</b> ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
6. <b>1 ml Waschpuffer</b> in alle Kavitäten pipettieren.
7. <b>5 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.
8. Die <b>EXTRACT-PLATE 48</b> ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
9. <b>Waschvorgang</b> (wie unter Schritt 6, 7 und 8 beschrieben) <b>wiederholen!</b>
10. Je <b>150 µl ACYL-BUFF</b> in alle Kavitäten pipettieren.
11. Je <b>25 µl ACYL-REAG</b> in alle Kavitäten pipettieren.
12. <b>20 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.
13. Die <b>EXTRACT-PLATE 48</b> ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
14. <b>1 ml Waschpuffer</b> in alle Kavitäten pipettieren.
15. <b>5 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.
16. Die <b>EXTRACT-PLATE 48</b> ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
17. <b>Waschvorgang</b> (wie unter Schritt 14, 15 und 16 beschrieben) <b>wiederholen!</b>
18. Je <b>200 µl HCL</b> in alle Kavitäten pipettieren.
19. <b>EXTRACT-PLATE 48</b> 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) inkubieren.
 <b>Überstand anschließend <u>nicht</u> verwerfen bzw. Platte nicht ausleeren!</b>
<b>190 µl der Überstände werden für die enzymatische Umsetzung benötigt</b>

## 6.3 Enzymatische Umsetzung


1. Jeweils <b>190 µl</b> der <b>extrahierten Standards, Kontrollen und Proben</b> in die entsprechenden Kavitäten der <b>µ 96</b> pipettieren.				
2. <b>50 µl Enzymlösung</b> (siehe 6.1) in die Kavitäten pipettieren.				
3. <b>µ 96</b> mit <b>FOIL</b> abdecken und für <b>1 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) schütteln.				
4. Für <b>2 Stunden</b> bei <b>37°C</b> inkubieren. Von den Überständen werden für den nachfolgenden ELISA folgende Volumina benötigt:				
<table border="1"><tr><td><b>Adrenaline</b></td><td><b>100 µl</b></td><td><b>Noradrenaline</b></td><td><b>10 µl</b></td></tr></table>	<b>Adrenaline</b>	<b>100 µl</b>	<b>Noradrenaline</b>	<b>10 µl</b>
<b>Adrenaline</b>	<b>100 µl</b>	<b>Noradrenaline</b>	<b>10 µl</b>	



## 6.4 Adrenalin ELISA

1.	Je <b>100 µl</b> der extrahierten <b>Standards, Kontrollen</b> und <b>Proben</b> aus der <b>Enzymplatte</b> (siehe 6.3) in die entsprechenden Kavitäten der <b>LI</b> <b>ADR</b> <b>MN</b> pipettieren.
2.	Jeweils <b>50 µl</b> des entsprechenden <b>ADR-AS</b> hinzugeben.
3.	Platte mit <b>FOIL</b> abdecken und für <b>1 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	<b>15 - 20 Stunden</b> (über Nacht) bei <b>2 – 8 °C</b> inkubieren.
5.	<b>FOIL</b> entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten <b>4 mal</b> gründlich mit <b>300 µl Waschpuffer</b> waschen, <b>ausleeren</b> und die Restflüssigkeit <b>jedes Mal</b> durch <b>Ausklopfen</b> auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
6.	<b>100 µl CONJUGATE</b> in alle Kavitäten pipettieren.
7.	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.
8.	<b>FOIL</b> entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten <b>4 mal</b> gründlich mit <b>300 µl Waschpuffer</b> waschen, <b>ausleeren</b> und die Restflüssigkeit <b>jedes Mal</b> durch <b>Ausklopfen</b> auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
9.	<b>100 µl SUBSTRATE</b> in alle Kavitäten pipettieren.
10.	Für <b>20 - 30 Min.</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.  <b>Direktes Sonnenlicht vermeiden!</b>
11.	<b>100 µl STOP-SOLN</b> in alle Kavitäten pipettieren.
12.	<b>Absorption</b> mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei <b>450 nm</b> (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620 - 650 nm) innerhalb von 10 Minuten <b>messen</b> .

## 6.5 Noradrenalin ELISA

1.	Je <b>10 µl</b> der extrahierten <b>Standards, Kontrollen</b> und <b>Proben</b> aus der <b>Enzymplatte</b> (siehe 6.3) in die entsprechenden Kavitäten der <b>LI</b> <b>NAD</b> <b>NMN</b> pipettieren.
2.	Jeweils <b>50 µl</b> des entsprechenden <b>NAD-AS</b> hinzugeben.
3.	Platte mit <b>FOIL</b> abdecken und für <b>1 Min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	<b>15 - 20 Stunden</b> (über Nacht) bei <b>2 – 8 °C</b> inkubieren.
5.	<b>FOIL</b> entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten <b>4 mal</b> gründlich mit <b>300 µl Waschpuffer</b> waschen, <b>ausleeren</b> und die Restflüssigkeit <b>jedes Mal</b> durch <b>Ausklopfen</b> auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
6.	<b>100 µl CONJUGATE</b> in alle Kavitäten pipettieren.
7.	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.
8.	<b>FOIL</b> entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten <b>4 mal</b> gründlich mit <b>300 µl Waschpuffer</b> waschen, <b>ausleeren</b> und die Restflüssigkeit <b>jedes Mal</b> durch <b>Ausklopfen</b> auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
9.	<b>100 µl SUBSTRATE</b> in alle Kavitäten pipettieren.
10.	Für <b>20 - 30 Min.</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.  <b>Direktes Sonnenlicht vermeiden!</b>
11.	<b>100 µl STOP-SOLN</b> in alle Kavitäten pipettieren.
12.	<b>Absorption</b> mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei <b>450 nm</b> (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620 - 650 nm) innerhalb von 10 Minuten <b>messen</b> .

## 7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Adrenalin	Noradrenalin
	10 – 3200 pg/ml	20 – 12800 pg/ml

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntenen Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Extinktionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) erstellt. Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) verwendet.

Die Konzentrationen der **unverdünnten Plasmaproben** und der **Kontrollen** können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

**Konzentration der verdünnten Plasmaproben:**

Falls ein Plasmavolumen von **< 600 µl** bei der Extraktion eingesetzt wurde, muss die abgelesene Konzentration von der Standardkurve mit einem **Volumenfaktor multipliziert** werden:

$$\text{Volumenfaktor} = \frac{600 \mu\text{l}}{\text{eingesetztes Plasmavolumen } (\mu\text{l})}$$

**Umrechnung**

Adrenalin (pg/ml) x 5,46 = Adrenalin (pmol/l)

Noradrenalin (pg/ml) x 5,91 = Noradrenalin (pmol/l)

**Erwartete Referenzwerte**

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

In einer Studie wurden Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem 2-Cat Plasma ELISA <sup>High Sensitive</sup> folgende Werte:

Erwartete Referenzbereiche	Adrenalin	Noradrenalin
		< 100 pg/ml

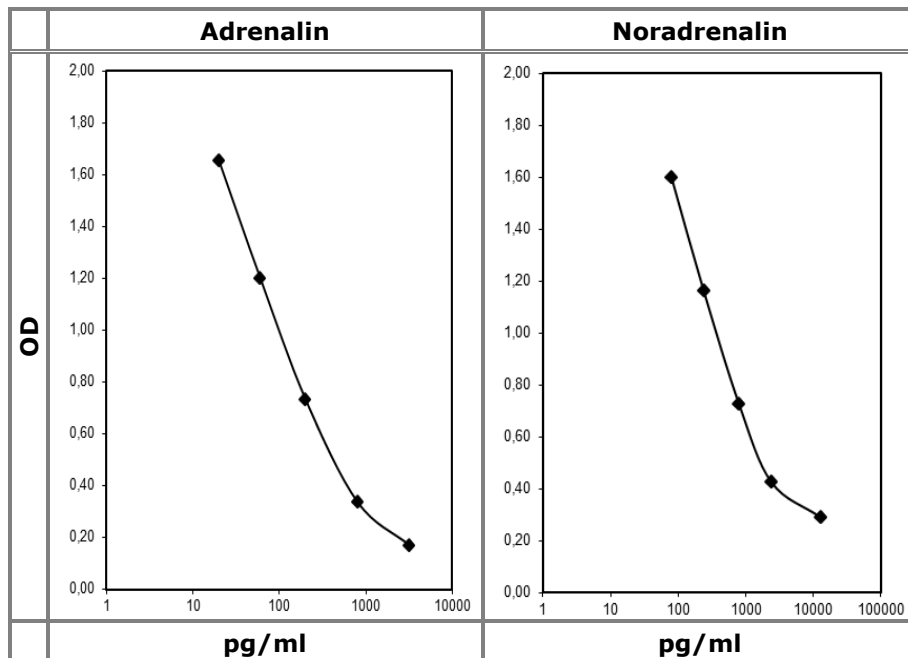
**7.1 Qualitätskontrolle**

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie die Kitkontrollen und/oder andere kommerzielle Kontrollproben im physiologischen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Die Kontrollproben müssen dabei 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 Spezifität (Kreuzreaktion)	Substanz	Kreuzreaktion (%)	
		Adrenalin	Noradrenalin
	Derivatisiertes Adrenalin	100	0,14
	Derivatisiertes Noradrenalin	0,20	100
	Derivatisiertes Dopamin	< 0,01	0,2
	Metanephrin	0,64	< 0,01
	Normetanephrin	< 0,01	0,48
	3-Methoxytyramin	< 0,01	< 0,01
	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol	0,03	0,01
	Tyramin	< 0,01	< 0,01
	Phenylalanin, Coffeinsäure, L-Dopa, Homovanillinsäure, Tyrosin, 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure	< 0,01	< 0,01

Analytische Sensitivität (600 µl unverdünnte Probe) Limit of Detection	Adrenalin	Noradrenalin
	5,2 pg/ml	20 pg/ml

Präzision				
Intra-Assay CV				
	Probe	Mittelwert (pg/ml)	SD (pg/ml)	CV (%)
Adrenalin	tief	54,0	9,1	16,8
	mittel	113	13,2	11,7
	hoch	447	48,2	10,8
Noradrenalin	tief	535	59,9	11,2
	mittel	679	75,9	11,2
	hoch	2123	344	16,2

Wiederfindung	Mittelwert (%)	Bereich (%)	Messbereich (pg/ml)
Adrenalin	110	93 - 121	38,9 - 2669
Noradrenalin	96	81 - 112	614 - 9606







Linearität		Serielle Verdünnung bis:	Mittelwert (%)	Bereich (%)
	Adrenalin	1:512	90	73 - 105
	Noradrenalin	1:512	96	76 - 107

## 9. Referenzen/Literatur

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

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

**Symbole:**

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	<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