



Gebrauchsanweisung

AND-CAT - ELISA


Enzymimmunoassay


für die quantitative Bestimmung von

Adrenalin / Noradrenalin / Dopamin
in Plasma und Urin



REF AND00

 3 x 96

 2 – 8 °C



WESAMIN GmbH & Co.KG / Gesellschaft für die Entwicklung und Produktion von
diagnostischen Artikeln mbH

Graff 1 • 24568 Oersdorf • Tel 04191-722 68 65 • Fax 04191-722 68 67

E-Mail: kontakt@wesamin.de • Internet: www.wesamin.de

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung und Testprinzip	Seite 4
2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite 5
3. Lagerung und Haltbarkeit	Seite 5
4. Inhalt des Testbestecks	Seite 6
5. Probengewinnung und -lagerung	Seite 9
6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben	Seite 10
7. Testdurchführung ELISA	Seite 13
Adrenalin ELISA	Seite 13
Noradrenalin ELISA	Seite 14
Dopamin n ELISA	Seite 15
8. Auswertung	Seite 16
9. Testcharakteristika	Seite 18
Pipettierschema Probenvorbereitung	Seite 22
Pipettierschema ELISA	Seite 23

1. Einführung und Testprinzip

Catecholamine ist die Bezeichnung für eine Gruppe von aromatischen Aminen (Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin, sowie deren Derivate), die als Hormone bzw. Neurotransmitter wirken. Adrenalin und Noradrenalin werden aus Dopamin gebildet. Sie wirken auf die Herzmuskulatur und den Stoffwechsel (Adrenalin), sowie auf den peripheren Kreislauf (Noradrenalin) und dienen so der Adaption des Körpers an akuten und chronischen Stress.

Eine vermehrte Bildung von Catecholaminen findet man bei Tumoren des chromaffinen Systems (Phäochromozytom, Neuroblastom, Ganglioneurom). Außerdem findet man erhöhte oder erniedrigte Catecholaminwerte bei Hypertonie, degenerativen Erkrankungen des Herzens, Schizophrenie und der manisch-depressiven Erkrankung. Bei Kindern mit Verdacht auf ein Neuroblastom ist die Bestimmung von Dopamin und seiner Derivate von besonderer diagnostischer Bedeutung.

Der AND-CAT - ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin in Plasma und Urin.

Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin werden mittels eines cis-Diol-spezifischen Boronat-Affinitätsgels extrahiert, acyliert und anschließend enzymatisch in N-Acylmetanephrin, N-Acylnormetanephrin und N-Acyl-3-Methoxytyramin umgewandelt.

Der AND-CAT - ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. Adrenalin, Noradrenalin bzw. Dopamin sind an die Festphase der Mikrotiterplatte gebunden. Acylierte Catecholamine aus der Probe und an die Festphase gebundene Catecholamine konkurrieren um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex in einem Waschschrift entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugats nachgewiesen und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Die TMB/POD-Reaktion wird gestoppt und bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration der Catecholamine in der Probe.

2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur in vitro Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in 4. *Inhalt des Testbestecks* und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden, diese können Reizungen und Verätzungen verursachen.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Zur Haltbarkeit der vorbereiteten Reagenzien siehe Vorbereitung der Reagenzien.

Alle Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

4. Inhalt des Testbestecks

Reagenzien für die Probenvorbereitung:

- | | | | |
|------|--|------------------|--------------|
| 4.1 | Extraktionsplatte
48 Vertiefungen
beschichtet mit Boronat-Affinitätsgel | EX-PLATE | 2 Stück |
| 4.2. | Extraktions-Puffer
6 ml, gebrauchsfertig | EX-BUFF | 1 Fläschchen |
| 4.3 | Salzsäure
21 ml, gebrauchsfertig
0,025 M HCl | HCL | 1 Fläschchen |
| 4.4 | Standards (1 - 7)
Je 4 ml, gebrauchsfertig,
Konzentrationen: | CAL 1 - 7 | 7 Fläschchen |

Standard:		1	2	3	4	5	6	7
Adrenalin	ng / ml	0	0,5	1,5	5	15	50	150
	nmol / l	0	2,7	8,2	27,3	81,9	273	819
Noradrenalin	ng / ml	0	1,5	5	15	50	150	500
	nmol / l	0	8,9	29,6	88,9	296	887	2.955
Dopamin	ng / ml	0	1,5	10	40	160	640	2.560
	nmol / l	0	9,8	65,3	261	1.045	4.179	16.717

Falls nur Urine bestimmt werden sollen, kann Standard 2 weggelassen werden.

Falls nur Plasmen bestimmt werden sollen, kann Standard 7 weggelassen werden.

- | | | | |
|-----|---|----------------------|--------------|
| 4.5 | Kontrolle 1 & 2
Je 4 ml, gebrauchsfertig
Konzentrationen: Siehe Q.C.-Zertifikat | CON 1 & 2 | 2 Fläschchen |
| 4.6 | Acylierungs-Reagenz
6 ml, gebrauchsfertig
Enthält DMSO und DMF
Bitte beachten: Lösungsmittel reagieren
mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschrälen.
Sie reagieren nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen. | ACYL-REAG | 1 Fläschchen |



Gefahr



Achtung

4.7	Acylierungs-Puffer 20 ml, gebrauchsfertig	ACYL-BUFF	1 Fläschchen
4.8	Enzym 2 ml/Fläschchen, lyophilisiert Catechol-O-Methyltransferase	ENZYME	4 Fläschchen
4.9	Coenzym 1 ml, gebrauchsfertig S-Adenosyl-L-Methionin	COENZYME	2 Fläschchen
4.10	Enzym-Puffer 2 ml, gebrauchsfertig	ENZYME-BUFF	1 Fläschchen



Achtung

Reagenzien für den ELISA:

4.11	Adrenalin-Antiserum 6 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen blau gefärbt	AS-AD	1 Fläschchen
4.12	Noradrenalin-Antiserum 6 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen gelb gefärbt	AS-NAD	1 Fläschchen
4.13	Dopamin-Antiserum 6 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen grün gefärbt	AS-DA	1 Fläschchen
4.14	MT-Streifen Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar vorbeschichtet mit: Adrenalin, blau markiert, Noradrenalin, gelb markiert Dopamin, farblos	STRIPS-AD STRIPS-NAD STRIPS-DA	12 Stück 12 Stück 12 Stück
4.15	POD-Konjugat 12 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen IgG-POD Konjugat	CONJ	3 Fläschchen
4.16	Waschpuffer 20 ml, Konzentrat Inhalt mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen	WASH	2 Fläschchen
4.17	Substrat 12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	SUB	3 Fläschchen
4.18	Stopplösung 12 ml, gebrauchsfertig Enthält 0,3M Schwefelsäure	STOP	3 Fläschchen
4.19	Haftklebefolie Gebrauchsfertig	FOIL	10 Stück

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten)

- Pipetten für 20, 50, 300, 1000 µl
- Multipipetten für 20, 50, 100, 150, 200, 250, 1000µl
- Schüttler (horizontal)
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Messung von Mikrotiterplatten
- Destilliertes Wasser

5. Probengewinnung und -lagerung

Plasma

Für den Test sollte EDTA-Plasma eingesetzt werden. Bei der Blutentnahme müssen bestimmte Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden, da durch psychische und physische Belastungen des Patienten die Konzentration der Catecholamine stark ansteigen kann. Es empfiehlt sich, dass der Patient mit liegender Kanüle ruht und die Blutentnahme erst 20 - 30 Minuten nach Venenpunktion erfolgt.

Hämolytische und insbesondere lipämische Plasmen sollten im Assay nicht eingesetzt werden, da sie zu falsch niedrigen Werten führen können.

Das Plasma kann bis zu 6 Stunden bei 2 -8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C bis zu 1 Woche gelagert werden.

Urin

Der gesamte Urin, der während einer Periode von 24 Stunden ausgeschieden wird, wird in einem Behälter, der 10 - 15 ml 6 N Salzsäure als Konservierungsmittel enthält, gesammelt. Direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden. Das Gesamtvolumen wird bestimmt und ein Aliquot für die Messung entnommen. Bei Verdacht auf eine Nierenfunktionsstörung sollte auch eine Kreatininbestimmung durchgeführt werden. Urinproben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert werden.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

6.1.1 Vorbereitung des Waschpuffers

Inhalt jedes Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen. Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar. Für eine Lagerung bis zum Verfallsdatum muss der verdünnte Waschpuffer bei -20 °C eingefroren werden.

6.1.2 Vorbereitung des Enzymmixes

ACHTUNG: Der Enzymmix darf erst 10 - 15 Minuten vor Gebrauch angesetzt werden. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Inhalt eines Fläschchens **ENZYME** mit 2 ml destilliertem Wasser auflösen. Anschließend 0,3 ml **COENZYME** und 0,3 ml **ENZYME-BUFF** dazupipettieren (Endvolumen 2,6 ml) und gut mischen.

Durch die vier Flaschen Enzym im Kit ist der ELISA in vier Ansätzen teilbar. Falls der Kit in einem Ansatz komplett verbraucht werden soll, sind mindestens drei Fläschchen mit frisch hergestelltem Enzymmix miteinander zu vereinigen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung der Standards, Kontrollen und der Proben ist für Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin identisch. Sie muss nur einmal, zusammen für alle drei Parameter in einer Extraktionsplatte, durchgeführt werden.

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Es wird empfohlen Doppelbestimmungen durchzuführen.

Es werden je 20 µl Standards, Kontrollen und Urinproben extrahiert.

Es werden je 300 µl Plasmaproben extrahiert.

1. Je **20 µl Standard 1 - 7**, je **20 µl Kontrolle 1 & 2**, je **20 µl Urin-Probe** in die entsprechende Vertiefung der Extraktionsplatte pipettieren. Zu den Standards, Kontrollen und Urinproben je **250 µl destilliertes Wasser** zum Volumenausgleich hinzugeben.
Je **300 µl Plasma-Probe** in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren (kein Volumenausgleich erforderlich).
2. Je **50 µl Extraktions-Puffer** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
5. Je **1 ml Waschpuffer** in alle Vertiefungen pipettieren und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz mischen.
6. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
7. Je **150 µl Acylierungs-Puffer** in alle Vertiefungen pipettieren.
8. Je **50 µl Acylierungs-Reagenz** in alle Vertiefungen pipettieren und sofort mit Punkt 9. fortfahren.
Bitte beachten: Lösungsmittel reagieren mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschrälchen. Sie reagieren nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.
9. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

10. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
11. Je **1 ml Waschpuffer** in alle Vertiefungen pipettieren und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz mischen.
12. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
13. Waschvorgang aus Punkt 11. und 12. einmal wiederholen.
14. Je **200 µl Salzsäure** zur Elution der Catecholamine in alle Vertiefungen pipettieren.
15. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

Vorsicht: Überstand anschließend nicht ausleeren!

Vom Überstand werden je 50 µl im Adrenalin-ELISA, je 50 µl im Noradrenalin-ELISA und je 50 µl im Dopamin-ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

Die ELISAs werden für Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin in getrennten Mikrotiterplatten durchgeführt.

7.1 Adrenalin ELISA

1. Je **20 µl** der frisch vorbereiteten **Enzymlösung** in alle Vertiefungen der Mikrotiterstreifen (blau markiert) pipettieren.
2. Je **50 µl vorbereitete Standards, Kontrollen und Patientenproben** in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Die entstehenden Rotfärbungen zeigen die bereits pipettierten Vertiefungen an.
3. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Je **50 µl Adrenalin-Antiserum (blau)** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Platte mit Haftklebefolie abdecken. Kurz auf dem Horizontalschüttler mischen und 12 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 6 °C inkubieren.
6. Vertiefungen entleeren, mit ca. **250 µl Waschpuffer** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.
7. Je **100 µl POD-Konjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
8. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
9. Waschen: Wie unter Punkt 6. beschrieben.
10. Je **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
11. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln. 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer Box abgedeckt, ohne schütteln, inkubieren.
12. Je **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
13. Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm innerhalb 15 Minuten (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

7.2 Noradrenalin ELISA

1. Je **20 µl** der frisch vorbereiteten **Enzymlösung** in alle Vertiefungen der Mikrotiterstreifen (gelb markiert) pipettieren.
2. Je **50 µl vorbereitete Standards, Kontrollen und Patientenproben** in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Die entstehenden Rotfärbungen zeigen die bereits pipettierten Vertiefungen an.
3. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Je **50 µl Noradrenalin-Antiserum (gelb)** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Platte mit Haftklebefolie abdecken. Kurz auf dem Horizontalschüttler mischen und 12 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 6 °C inkubieren.
6. Vertiefungen entleeren, mit ca. **250 µl Waschpuffer** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.
7. Je **100 µl POD-Konjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
8. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
9. Waschen: Wie unter Punkt 6. beschrieben.
10. Je **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
11. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln. 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer Box abgedeckt, ohne schütteln, inkubieren.
12. Je **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
13. Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm innerhalb 15 Minuten (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

7.3 Dopamin ELISA

1. Je **20 µl** der frisch vorbereiteten **Enzymlösung** in alle Vertiefungen der Mikrotiterstreifen (farblos) pipettieren.
2. Je **50 µl vorbereitete Standards, Kontrollen und Patientenproben** in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Die entstehenden Rotfärbungen zeigen die bereits pipettierten Vertiefungen an.
3. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Je **50 µl Dopamin-Antiserum (grün)** in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Platte mit Haftklebefolie abdecken. Kurz auf dem Horizontalschüttler mischen und 12 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 6 °C inkubieren.
6. Vertiefungen entleeren, mit ca. **250 µl Waschpuffer** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.
7. Je **100 µl POD-Konjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
8. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
9. Waschen: Wie unter Punkt 6. beschrieben.
10. Je **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
11. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln. 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer Box abgedeckt, ohne schütteln, inkubieren.
12. Je **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
13. Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm innerhalb 15 Minuten (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

8. Auswertung

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen. Alternativ kann auch die Cubic-Spline-Methode oder die Logit-Log-Berechnung verwendet werden.

Die Konzentrationen der Patientenproben können dann direkt aus der Standardkurve in ng/ml abgelesen werden.

Die abgelesenen Konzentrationen der Urinproben und der Kontrollen können ohne weitere Umrechnung übernommen werden.

Die abgelesenen Konzentrationen der Plasmaproben müssen durch den **Faktor 15 geteilt** werden, da bei der Extraktion 300 µl Plasmaprobe im Verhältnis zu 20 µl Standard eingesetzt werden.

Umrechnung:

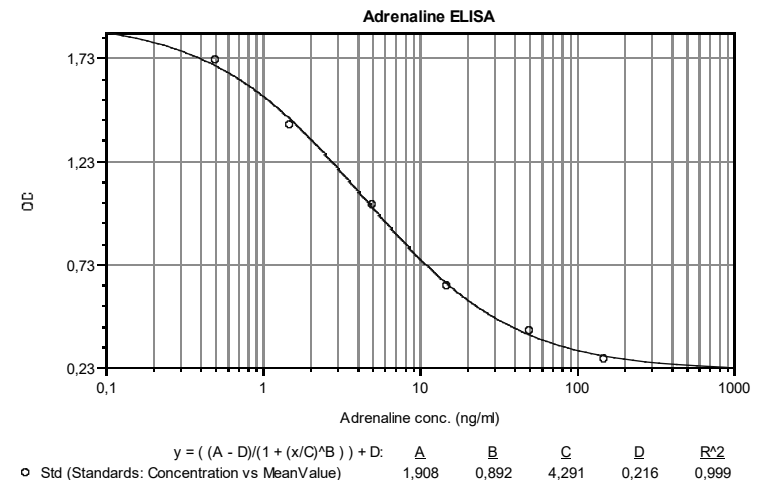
Adrenalin: 1 ng / ml = 5,46 nmol / l

Noradrenalin: 1 ng / ml = 5,91 nmol / l

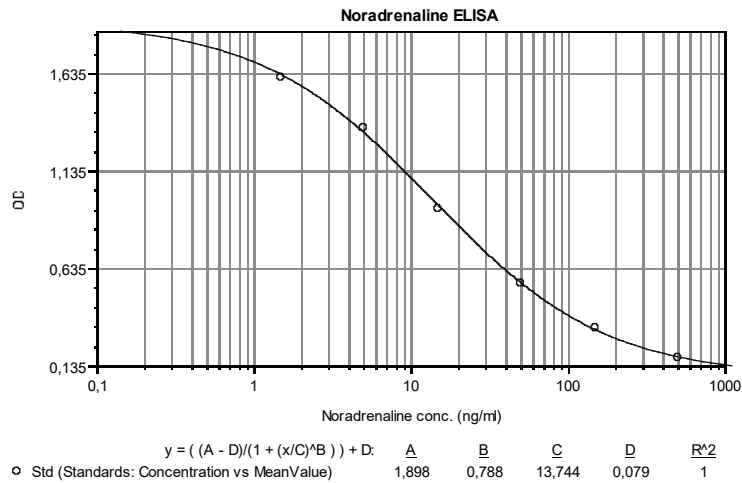
Dopamin: 1 ng / ml = 6,53 nmol / l

8.1 Typische Beispiele

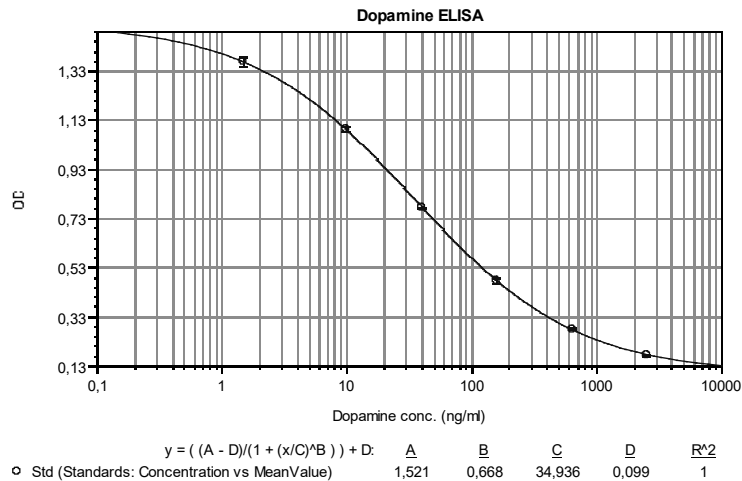
8.1.1 Adrenalin ELISA



8.1.2 Noradrenalin ELISA



8.1.3 Dopamin ELISA



9. Testcharakteristika

9.1 Adrenalin

Referenzbereiche

Die angegebenen Referenzbereiche gelten lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

Matrix	Referenzbereich
Urin	< 20 µg/Tag
EDTA-Plasma	< 100 pg/ml

Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Urin	0,08 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD
EDTA-Plasma	5 pg/ml	OD _{Cal1} - 2xSD

Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Adrenalin	100
Noradrenalin	0,053
Dopamin	< 0,01
Metanephrin	< 0,01
Normetanephrin	< 0,001
3-Methoxytyramin	< 0,001
L-Dopa	< 0,001
Tyramin	< 0,001
Tyrosin	< 0,001
Homovanillinsäure	< 0,0001
Vanillinmandelsäure	< 0,0001

Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	2,1 – 30,3	102	100 - 105
EDTA-Plasma	0,02 – 1,39	101	94 – 103

Linearität

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich
Urin	4,4 – 59,7	1 : 15 mit dest. Wasser	108	100 - 112
EDTA-Plasma	0,11 – 1,52	1 : 15 mit dest. Wasser	107	104 - 111

Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk	Bereich (ng/ml)	Inter-Assay-Vk
Urin	3,1 – 15,2	7,6 – 7,3 %	2,6 – 16,6	6,7 – 9,6 %
EDTA-Plasma	0,12 – 1,19	9,6 – 9,5 %		

Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Urin	HPLC	Y = 0,94 x HPLC - 0,21; R = 0,987; N = 32

9.2 Noradrenalin

Referenzbereiche

Die angegebenen Referenzbereiche gelten lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

Matrix	Referenzbereich
Urin	< 90 µg/Tag
EDTA-Plasma	< 600 pg/ml

Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Urin	0,67 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD
EDTA-Plasma	45 pg/ml	OD _{Cal1} - 2xSD

Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Noradrenalin	100
Adrenalin	< 0,01
Dopamin	0,37
Metanephrin	< 0,01
Normetanephrin	< 0,01
3-Methoxytyramin	< 0,01
L-Dopa	< 0,01
Tyramin	< 0,01
Tyrosin	< 0,001
Homovanillinsäure	< 0,001
Vanillinmandelsäure	< 0,001

Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	32,4 – 113,2	93	89 - 98
EDTA-Plasma	0,20 – 4,91	104	91 – 109

Linearität

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	9,9 – 132,3	1 : 15 mit dest. Wasser	105	98 - 112
EDTA-Plasma	0,33 – 4,87	1 : 15 mit dest. Wasser	103	100 - 108

Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk	Bereich (ng/ml)	Inter-Assay-Vk
Urin	21,8 – 76,4	8,7 – 9,2 %	23,1 – 83,9	11,1 – 8,7 %
EDTA-Plasma	0,76 – 4,85	8,4 – 9,7 %		

Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Urin	HPLC	Y = 0,90 x HPLC + 6,3; R = 0,983; N = 32

9.3 Dopamin

Referenzbereiche

Die angegebenen Referenzbereiche gelten lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

Matrix	Referenzbereich
Urin	< 600 µg/Tag
EDTA-Plasma	< 100 pg/ml

Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Urin	0,43 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD
EDTA-Plasma	29 pg/ml	OD _{Cal1} - 2xSD

Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Dopamin	100
Adrenalin	< 0,02
Noradrenalin	0,45
Metanephrin	< 0,01
Normetanephrin	< 0,01
3-Methoxytyramin	< 0,01
L-Dopa	< 0,01
Tyramin	< 0,01
Tyrosin	< 0,002
Homovanillinsäure	< 0,001
Vanillinmandelsäure	< 0,001

Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	136 – 479	92	90 - 96
EDTA-Plasma	0,01 – 17,1	101	91 – 110

Linearität

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	48 – 750	1 : 15 mit dest. Wasser	98	95 - 101
EDTA-Plasma	0,45 – 5,86	1 : 15 mit dest. Wasser	107	97 - 115

Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk	Bereich (ng/ml)	Inter-Assay-Vk
Urin	111 – 426	9,3 – 10,1 %	108 – 400	10,1 – 10,7 %
EDTA-Plasma	0,66 – 5,10	13,0 – 8,2 %		

Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Urin	HPLC	Y = 0,90 x HPLC + 24; R = 0,982; N = 32

9.4 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Vergleich mit den Referenzbereichen und den Methodenvergleichen festgestellt.

9.5 Grenzen der Methode

Das Ergebnis des AND-CAT Elisas ist im Zusammenhang mit weiteren diagnostischen Verfahren und der Anamnese und der daraus resultierenden Fragestellung zu sehen.

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit dem entsprechenden Medium (s. Linearität) verdünnt und erneut bestimmt werden.

9.6 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Nicht angesäuerte Sammelurine nicht verwenden.

Pipettierschema - Probenvorbereitung

(Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin)

Gleichzeitig für Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin in einer Extraktionsplatte

	Standards	Kontrollen	Urin	Plasma
Standard 1 - 7	20			
Kontrolle 1&2		20		
Patient Urin			20	
Patient Plasma				300
Dest. Wasser	250	250	250	
Extraktions-Puffer	50	50	50	50

60 Minuten bei RT mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer	1.000	1.000	1.000	1.000
-------------	-------	-------	-------	-------

5 Minuten bei RT vorsichtig mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Acyl.-Puffer	150	150	150	150
Acyl.-Reagenz	50	50	50	50

Sofort 20 Minuten bei RT mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer	1.000	1.000	1.000	1.000
-------------	-------	-------	-------	-------

5 Minuten bei RT vorsichtig mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

Waschpuffer	1.000	1.000	1.000	1.000
-------------	-------	-------	-------	-------

5 Minuten bei RT vorsichtig mischen

Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

HCl	200	200	200	200
-----	-----	-----	-----	-----

Mit Folie abkleben; 20 Minuten bei RT mischen

Platte anschließend nicht ausleeren

**Adrenalin
Noradrenalin
Dopamin**

je **50 µl** in den ELISA einsetzen
je **50 µl** in den ELISA einsetzen
je **50 µl** in den ELISA einsetzen

Pipettierschema - ELISA (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin)

Für Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin in **getrennten** Mikrotiterplatten (MTP):

	Standards	Kontrollen	Proben
Adrenalin (blau):			
Enzymmix (frisch)	20	20	20
Standard 1 - 7	50		
Kontrollen 1&2		50	
Proben			50
Mit Folie abkleben; 30 Minuten bei RT mischen			
Adrenalin Antiserum	50	50	50
Noradrenalin (gelb):			
Enzymmix (frisch)	20	20	20
Standard 1 - 7	50		
Kontrollen 1&2		50	
Proben			50
Mit Folie abkleben; 30 Minuten bei RT mischen			
Noradrenalin Antiserum	50	50	50
Dopamin (farblos):			
Enzymmix (frisch)	20	20	20
Standard 1 - 7	50		
Kontrollen 1&2		50	
Proben			50
Mit Folie abkleben; 30 Minuten bei RT mischen			
Dopamin Antiserum (grün)	50	50	50

Platten mit Folie abkleben
Kurz auf dem Horizontalschüttler mischen und für
12 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 6 °C inkubieren

4 x waschen

POD-Konjugat	100	100	100
--------------	-----	-----	-----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x waschen

Substrat	100	100	100
----------	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln
30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt (Box), ohne schütteln

Stopplösung	100	100	100
-------------	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln
Messung der Extinktion bei 450 nm