



## Instructions for Use

# Noradrenaline ELISA

IVD

CE

REF EIA-4317



96



DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße 18, D-35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)



DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.**  
**Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.**  
**Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.**  
**Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.**  
**Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

<b>Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen / Modifiche introdotte / Modificaciones introducidas / Modifications apportées</b>	
The following changes have been made in comparison to the previous version: Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen: Rispetto alla versione precedente, sono state apportate le seguenti modifiche: Se han introducido los siguientes cambios en comparación con la versión anterior: Les modifications suivantes ont été apportées par rapport à la version précédente :	
1.1 Intended Use and principle of the test	
2.1 Procedural cautions, guidelines, warning and limitations	
4.1 Contents of the kit	
Throughout the document	

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	INTRODUCTION.....	2
2	PROCEDURAL CAUTIONS, GUIDELINES, WARNINGS AND LIMITATIONS.....	2
3	STORAGE AND STABILITY .....	3
4	MATERIALS.....	4
5	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE .....	6
6	TEST PROCEDURE .....	6
7	CALCULATION OF RESULTS.....	8
8	ASSAY CHARACTERISTICS.....	9
9	REFERENCES/LITERATURE.....	10
1	EINLEITUNG.....	11
2	VERFAHRENSHINWEISE, RICHTLINIEN, WARNUNGEN UND ANWENDUNGSGRENZEN .....	11
3	LAGERUNG UND HALTBARKEIT .....	13
4	MATERIALIEN .....	13
5	PROBENMATERIAL UND LAGERUNG .....	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	15
7	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE .....	17
8	TESTCHARAKTERISTIKA.....	18
9	REFERENZEN/LITERATUR .....	19
	SYMBOLS USED.....	20

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended use and principle of the test

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

Noradrenaline (norepinephrine) is extracted by using a cis-diol-specific affinity gel, acylated and then converted enzymatically.

The subsequent competitive ELISA uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The acylated standards, controls and samples compete with 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 resulting in a colour reaction. The reaction is monitored at a wavelength of 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standard concentrations. Manual processing of the ELISA is recommended. The use of automatic laboratory equipment is the responsibility of the user. This in-vitro diagnostic is for professional use only.

### 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 adaptation 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 abnormal low or high levels of catecholamines

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if these results are assessed in accordance quality criteria of the method. 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.

## 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 must be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. This assay was validated for a certain type of sample as indicated in *Intended Use* (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
3. The principles of Good Laboratory Practice (GLP) must be followed.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
5. If serious incidents should occur in connection with this product, they should be reported to the manufacturer and the competent national authorities.
6. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
7. 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. Microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up.
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 wells 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. 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.
16. 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. Rinse contaminated items before reuse.
17. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is made available upon request.
18. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.
19. The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
20. In case of any severe damage to the test kit or components, the manufacturer has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components must not be used for a test run. They must be stored properly until the manufacturer decides what to do with them. If it is decided that they are no longer suitable for measurements, they must be disposed of in accordance with national regulations.
21. The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but must be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.

## 2.2 Limitations

Any inappropriate handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 2.2.1 Interfering substances and proper handling of specimens

#### Plasma

Samples containing precipitates or fibrin strands or which are hemolytic or lipemic might cause inaccurate results. Hemolytic samples (up to 4 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 50 mg/dl bilirubin) and lipemic samples (up to 800 mg/dl triglycerides) have no influence on the assay results.

If the concentrations cannot be estimated and there are doubts as to whether the above limit values for hemolytic, icteric or lipemic samples are complied with, the samples should not be used in the assay.

#### 24-hour urine

Please note the sample collection! If the percentage of the final concentration of acid is too high, this will lead to incorrect results for the urine samples.

### 2.2.2 Drug and food interferences

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

### 2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

## 3 STORAGE AND STABILITY

Store kit and reagents at 2 °C - 8 °C until expiration date.

Do not use kit and components beyond the expiry date indicated on the kit labels.

Once opened the reagents are stable for 2 months when stored at 2 °C - 8 °C.

Once the resealable pouch of the ELISA plate has been opened, care should be taken to close it tightly again including the desiccant.

## 4 MATERIALS

### 4.1 Contents of the kit

	<b>FOILS</b>	<b>Adhesive Foil</b> - ready to use
Content:	Adhesive foils in a resealable pouch	
Number:	1 x 4 foils	
	<b>WASH-CONC 50x</b>	<b>Wash Buffer Concentrate</b> - Concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 mL/vial, purple cap	
	<b>CONJUGATE</b>	<b>Enzyme Conjugate</b> - ready to use
Content:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 mL/vial, red cap	
Description:	Species is goat	
	<b>SUBSTRATE</b>	<b>Substrate</b> - ready to use
Content:	Chromogenic substrate containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 mL/vial, black cap	
	<b>STOP-SOLN</b>	<b>Stop Solution</b> - ready to use
Content:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 mL/vial, light grey cap	
	<b>■■■ NAD NMN</b>	<b>Noradrenaline Microtiter Strips</b> - ready to use
Content:	1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable yellow pouch with desiccant	
	<b>NAD-AS</b>	<b>Noradrenaline Antiserum</b> - ready to use
Content:	Rabbit anti-noradrenaline antibody in buffer with proteins and non-mercury preservative, yellow coloured	
Volume:	1 x 6 mL/vial, yellow cap	
Description:	Species of antibody is rabbit, species of protein in buffer is bovine	
	<b>ACYL-REAG</b>	<b>Acylation Reagent</b> - ready to use
Content:	Acylation reagent in DMSO	
Volume:	1 x 3 mL/vial, white cap	
	<b>ADJUST-BUFF</b>	<b>Adjustment Buffer</b> - ready to use
Content:	TRIS buffer	
Volume:	1 x 4 mL/vial, green cap	
	<b>ACYL-BUFF</b>	<b>Acylation Buffer</b> - ready to use
Content:	Buffer with light alkaline pH for the acylation	
Volume:	1 x 20 mL/vial, white cap	

**ASSAY-BUFF****Assay Buffer - ready to use**

Content: 1M hydrochloric acid and a non-mercury preservative  
 Volume: 1 x 6 mL/vial, grey cap  
 Hazard pictograms: 

**GHS05**

Signal word: Danger  
 Hazard statements: H314 Causes severe skin burns and eye damage.  
 Precautionary statements: P280 Wear protective gloves, protective clothing, eye protection.  
 P303+P361+P353 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water.  
 P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.  
 P310 Immediately call a doctor, a POISON CENTER.  
 P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.

**COENZYME****Coenzyme - ready to use**

Content: S-adenosyl-L-methionine  
 Volume: 1 x 4 mL/vial, purple cap

**ENZYME****Enzyme - lyophilized**

Content: Catechol-O-methyltransferase  
 Volume: 2 vials, pink cap  
 Description: Catechol-O-methyltransferase from pig liver

**EXTRACT-BUFF****Extraction Buffer - ready to use**

Content: Buffer containing carbonate  
 Volume: 1 x 6 mL/vial, brown cap

**EXTRACT-PLATE 48****Extraction Plate - ready to use**

Content: 2 x 48 well plates coated with boronate affinity gel in a resealable pouch

**HCL****Hydrochloric Acid - ready to use**

Content: 0.025 M Hydrochloric Acid, yellow coloured  
 Volume: 1 x 20 mL/vial, green cap

**Standards and Controls - Ready to use**

Component	Colour/Cap	Concentration ng/mL <b>NAD</b>	Concentration nmol/L <b>NAD</b>	Volume/ Vial
<b>STANDARD A</b>	white	0	0	4 mL
<b>STANDARD B</b>	yellow	5	30	4 mL
<b>STANDARD C</b>	orange	20	118	4 mL
<b>STANDARD D</b>	blue	75	443	4 mL
<b>STANDARD E</b>	grey	250	1478	4 mL
<b>STANDARD F</b>	black	1000	5910	4 mL
<b>CONTROL 1</b>	green	Refer to QC report for expected value and acceptable range!		4 mL
<b>CONTROL 2</b>	red			4 mL

Conversion: Noradrenaline (ng/mL) x 5.91 = Noradrenaline (nmol/L)

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

#### 4.2 Additional materials required but not provided in the kit

- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Absorbent material (paper towel)

#### 4.3 Additional materials and equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 – 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)
- Vortex mixer

### 5 SAMPLE COLLECTION, HANDLING AND STORAGE

#### Plasma

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing EDTA as anti-coagulant and centrifuged according to manufacturer's instructions immediately after collection.

In case of hemolytic, icteric or lipemic samples see 2.2.1.

Storage: up to 6 hours at 2 °C - 8 °C,  
for longer period (up to 6 months) 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.

Storage: up to 48 hours at 2 °C - 8 °C,  
up to 24 hours at room temperature,  
for longer periods (up to 6 months) at -20 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided.

Avoid exposure to direct sunlight.

### 6 TEST PROCEDURE

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the Extraction Plate and microwell plates (Microtiter Strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up). Duplicate determinations are recommended.

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. Varying incubation times will have similar influences on the absorbance. The optimal temperature during the enzyme immunoassay is between 20 °C – 25 °C.

**⚠** *The use of a microtiter plate shaker with the following specifications is mandatory: shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm. Shaking with differing settings might influence the results.*

#### 6.1 Preparation of reagents

##### Wash Buffer

Dilute the 20 mL **WASH-CONC 50X** with water to a final volume of 1000 mL.

Storage: 2 months at 2 °C - 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 **ADJUST-BUFF**. 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!*

## Noradrenaline Microtiter Strips

In rare cases residues of the blocking and stabilizing reagent can be seen in the wells as small, white dots or lines. These residues do not influence the quality of the product.

## Acylation Reagent

The **ACYL-REAG** has a freezing point of 18.5 °C. To ensure that it is liquid when being used, it must be ensured that the Acylation Reagent has reached room temperature and forms a homogeneous, crystal-free solution before being used.

### 6.2 Sample preparation, extraction and acylation

1. Pipette **10 µL** of **standards, controls, urine samples** and **300 µL** of **plasma samples** into the respective wells of the **EXTRACT-PLATE 48**.
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-BUFF** into all wells.
4. Pipette **50 µL** of **EXTRACT-BUFF** into all wells.
5. Cover plate with **FOILS** and incubate **30 min at RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
6. Remove the foil. Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
7. Pipette **1 mL** of **Wash Buffer** into all wells. Incubate the plate for **5 min at RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm). Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
8. Pipette another **1 mL** of **Wash Buffer** into all wells. Incubate the plate for **5 min at RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm). Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
9. Pipette **150 µL** of **ACYL-BUFF** into all wells.
10. Pipette **25 µL** of **ACYL-REAG** into all wells.
11. Incubate **15 min at RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
12. Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
13. Pipette **1 mL** of **Wash Buffer** into all wells. Incubate the plate for **10 min at RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm). Empty plate and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
14. Pipette **150 µL** of **HCL** into all wells.
15. Cover plate with **FOILS**. Incubate **10 min at RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm). Remove the foil and discard.



**Do not decant the supernatant thereafter!**

The following volumes of the supernatant are needed for the subsequent ELISA:

<b>Noradrenaline</b>	<b>20 µL</b>
----------------------	--------------

### 6.3 Noradrenaline ELISA

1. Pipette **25 µL** of the **Enzyme Solution** (refer to 6.1) into all wells of the **W NAD NMN**.
2. Pipette **20 µL** of the extracted **standards, controls and samples** into the appropriate wells.
3. Incubate for **30 min at RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
4. Pipette **50 µL** of the **NAD-AS** into all wells and cover plate with **FOILS**.
5. Incubate for **2 h at RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
6. Remove the foil. Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate **3 x** by adding **300 µL** of **Wash Buffer**, **discarding** the content and **blotting dry each time** by tapping the inverted plate on absorbent material.
7. Pipette **100 µL** of the **CONJUGATE** into all wells.
8. Incubate for **30 min at RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
9. Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate **3 x** by adding **300 µL** of **Wash Buffer**, **discarding** the content and **blotting dry each time** by tapping the inverted plate on absorbent material.
10. Pipette **100 µL** of the **SUBSTRATE** into all wells and incubate for **25 ± 5 min at RT** (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm). **Avoid exposure to direct sunlight!**
11. Add **100 µL** of the **STOP-SOLN** to all wells and shake the microtiter plate shortly.
12. **Read** the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to **450 nm** (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

## 7 CALCULATION OF RESULTS

Measuring range		Noradrenaline
	Urine	2.5 - 1000 ng/mL
	Plasma	93 – 33333 pg/mL

The standard curve, which can be used to determine the concentration of the unknown samples, is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis) using a concentration of 0.001 ng/ml for Standard A (this alignment is mandatory because of the logarithmic presentation of the data). Use non-linear regression for curve fitting (e. g. 4-parameter, marquardt).

 *This assay is a competitive assay. This means: the OD-values are decreasing with increasing concentrations of the analyte. OD-values 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 and 2** can be read directly from the standard curve.

Calculate the 24 h excretion for each urine sample:  $\mu\text{g}/24\text{ h} = \mu\text{g/L} \times \text{L}/24\text{ h}$

### Plasma samples

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

### Conversion

Noradrenaline [ng/mL]  $\times$  5.91 = Noradrenaline [nmol/L]

#### 7.1 Expected reference value

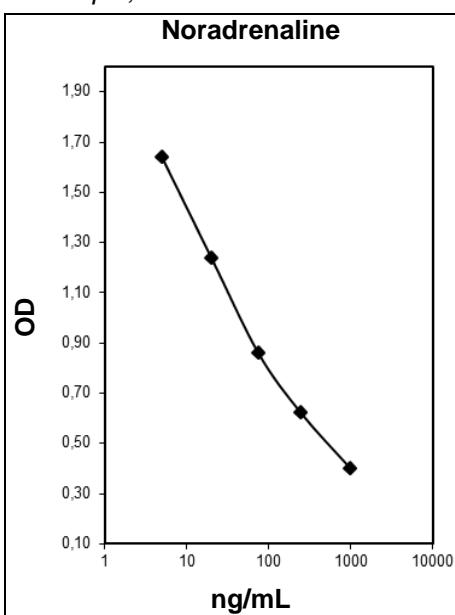
It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

	Noradrenaline
24-hour urine	< 90 $\mu\text{g}/\text{day}$ (535 nmol/day)
Plasma	< 600 pg/mL

#### 7.2 Typical standard curve



*Example, do not use for calculation!*



## 8 CONTROL SAMPLES

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. Commercially obtained control samples should be treated like unknown samples. Control samples should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC-Report.

## 9 ASSAY CHARACTERISTICS

<b>Analytical Sensitivity</b>		
<b>Noradrenaline</b>		
Limit of Blank (LOB)	Urine [ng/ml]	1.5
	Plasma [pg/ml]	32
Limit of Detection (LOD)	Urine [ng/ml]	1.7
	Plasma [pg/ml]	36
Limit of Quantification (LOQ)	Urine [ng/ml]	2.5
	Plasma [pg/ml]	93

<b>Analytical Specificity (Cross Reactivity)</b>	
<b>Substance</b>	<b>Cross Reactivity [%]</b>
	Noradrenaline
Derivatized Adrenaline	0.08
Derivatized Noradrenaline	100
Derivatized Dopamine	0.03
Metanephrine	< 0.01
Normetanephrine	0.16
3-Methoxytyramine	< 0.01
3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol	< 0.01
Tyramine	< 0.01
Phenylalanine, Caffeinic acid, L-Dopa, Homovanillic acid, Tyrosine, 3-Methoxy-4-hydroxymandelic acid	< 0.01

<b>Precision</b>							
<b>Intra-Assay Urine (n = 60)</b>				<b>Intra-Assay Plasma (n = 60)</b>			
	<b>Sample</b>	<b>Range (ng/mL)</b>	<b>CV (%)</b>		<b>Sample</b>	<b>Range (pg/mL)</b>	<b>CV (%)</b>
Noradrenaline	1	26.1 ± 3.6	13.8	Noradrenaline	1	510 ± 65	12.8
	2	97 ± 12.8	13.4		2	1358 ± 194	14.3
	3	267 ± 35	13.1		3	3363 ± 374	11.1
<b>Inter-Assay Urine (n = 33)</b>				<b>Inter-Assay Plasma (n = 18)</b>			
Noradrenaline	<b>Sample</b>	<b>Range (ng/mL)</b>	<b>CV (%)</b>	Noradrenaline	<b>Sample</b>	<b>Range (pg/mL)</b>	<b>CV (%)</b>
	1	19.5 ± 3.9	20.0		1	445 ± 40.9	9.2
	2	80.6 ± 10.6	13.2		2	1232 ± 134	10.9
	3	226 ± 39.5	17.4		3	3283 ± 302	9.2

<b>Linearity</b>			<b>Serial dilution up to</b>	<b>Range (%)</b>	<b>Mean (%)</b>
	Noradrenaline		Urine	1:512	112
		Plasma	1:512	102 - 125	112

<b>Recovery</b>			<b>Mean (%)</b>	<b>Range (%)</b>	<b>Range</b>
	Noradrenaline		Urine	91 - 113	58.6 – 260 ng/mL
		Plasma	87	75 - 107	51 – 14,251 pg/mL

## 10 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.*

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Noradrenalin (Norepinephrin) in Plasma und Urin.

Noradrenalin wird mittels eines cis-diolspezifischen Boronat-Affinitätsgels aus der Probe extrahiert, danach azyliert und anschließend enzymatisch umgewandelt.

Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen an die als feste Phase der Mikrotiterplatte gebunden. Die azylierten 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 freien Antigene und Antigen-Antikörperkomplexe durch Waschen entfernt. Der an die feste Phase gebundene Antikörper wird mit einem Peroxidase markierten anti-Kaninchen-Antikörper gebunden und mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die Konzentrationen der unbekannten Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen und Abgleich der gemessenen Absorptionen ermittelt. Die manuelle Abarbeitung des ELISAs wird empfohlen. Die Verwendung von automatischen Laborgeräten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Dieses In-Vitro-Diagnostikum ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

### 1.2 Klinische Anwendung

Die Katecholamine Adrenalin (Epinephrin), Noradrenalin (Norepinephrin) 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 bestimbar.

In der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von Tumoren des sympathico-adrenalen Systems wie z.B. dem Phäochromozytom, spielen die Katecholamine neben den Metanephriten/Normetanephriten 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 Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, Schizophrenie und manische Depression mit 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.

## 2 VERFAHRENSHINWEISE, RICHTLINIEN, WARNUNGEN UND ANWENDUNGSGRENZEN

### 2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

1. Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Gebrauchsanweisung 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. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (Kittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille) ist zu tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
5. Falls in Zusammenhang mit diesem Produkt schwerwiegende Vorfälle auftreten sollten, sollen diese dem Hersteller und den zuständigen nationalen Behörden gemeldet werden.
6. Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig aber gründlich gemischt werden. Verwenden Sie für Verdünnungs- oder Rekonstitutionszwecke deionisiertes, destilliertes oder ultrareines Wasser. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
7. Die Mikrotiterplatte verfügt über einzeln herausnehmbare und abbrechbare Streifen. Unge nutzte Wells müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden. Die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden.

8. Proben sollten in Doppelbestimmung gemessen werden.
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 Wells 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 Vertrauengrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauengrenzen 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. 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.
16. 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.
17. Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe das Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist auf Anfrage erhältlich.
18. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potentiell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
19. Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
20. Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen sachgerecht gelagert werden, bis der Hersteller entscheidet, wie mit ihnen zu verfahren ist. Sollte entschieden werden, dass sie für Messungen nicht mehr geeignet sind, müssen sie entsprechend den nationalen Richtlinien entsorgt werden.
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.

## 2.2 Grenzen des Tests

Jede unsachgemäße Behandlung der Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### 2.2.1 Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben

#### Plasma

Proben, die Präzipitate oder Fibrinfäden enthalten oder die hämolytisch oder lipämisch sind, können zu ungenauen Ergebnissen führen.

Hämolytische Proben (bis zu 4 mg/mL Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 50 mg/dL Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 800 mg/dL Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse.

Sollten die Konzentrationen nicht abzuschätzen sein und Zweifel bestehen, ob die oben genannten Grenzwerte für hämolytische, ikterische oder lipämische Proben eingehalten werden, sollten die Proben nicht im Assay eingesetzt werden.

#### Sammelurin

Porbensammlung beachten! Ist der Säuregehalt des 24-Stunden-Sammelurins zu hoch, führt dies zu falschen Ergebnissen der Urinproben.

### 2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel

Bislang sind keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des Noradrenalin-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

Das Kit sind bei 2 °C - 8 °C bis zum Verfallsdatum gelagert werden.

Das Kit und die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

Einmal geöffnet sind die Reagenzien 2 Monate stabil, wenn sie bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Der einmal geöffnete Folienbeutel der ELISA-Platte sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

### 4 MATERIALIEN

#### 4.1 Reagenzien im Kit

	<b>FOILS</b>	<b>Selbstklebende Folie</b> - gebrauchsfertig
Inhalt:	4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Anzahl:	1 x 4 Folien	
	<b>WASH-CONC 50x</b>	<b>Wash Buffer Concentrate</b> - 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 mL/Fläschchen, Deckel lila	
	<b>CONJUGATE</b>	<b>Enzymkonjugat</b> - gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege Anti-Kaninchen Immunoglobuline, konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 mL/ Fläschchen, Deckel rot	
Beschreibung:	Spezies ist Ziege	
	<b>SUBSTRATE</b>	<b>Substrat</b> - gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 mL/ Fläschchen, Deckel schwarz	
	<b>STOP-SOLN</b>	<b>Stoplösung</b> - gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 mL/ Fläschchen, Deckel grau	
	<b>W NAD NMN</b>	<b>Noradrenalin Mikrotiterstreifen</b> - gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem gelben wiederverschließbaren Beutel	
	<b>NAD-AS</b>	<b>Noradrenalin Antiserum</b> - gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen Anti-Noradrenalin Antikörper im Proteinpuffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel, gelb gefärbt	
Volumen:	1 x 6 mL/Fläschchen, Deckel gelb	
Beschreibung:	Spezies vom Antikörper ist Kaninchen, Spezies vom Protein im Puffer ist Rind	
	<b>ACYL-REAG</b>	<b>Azylierungsreagenz</b> - gebrauchsfertig
Inhalt:	Azylierungsreagenz in DMSO	
Volumen:	1 x 3 mL/ Fläschchen, Deckel weiß	
	<b>ADJUST-BUFF</b>	<b>Adjustment Buffer</b> - gebrauchsfertig
Inhalt:	TRIS Puffer zur pH-Wert Einstellung	
Volumen:	1 x 4 mL/ Fläschchen, Deckel grün	
	<b>ACYL-BUFF</b>	<b>Acylation Buffer</b> - gebrauchsfertig
Inhalt:	Leicht basischer Puffer zur Azylierung mit quecksilberfreien Stabilisatoren	
Volumen:	1 x 20 mL/ Fläschchen, Deckel weiß	

**ASSAY-BUFF****Assaypuffer - gebrauchsfertig**

Inhalt: 1M Salzsäure mit quecksilberfreien Stabilisatoren

Volumen: 1 x 6 mL/Fläschchen, Deckel grau



GHS05

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

Sicherheitshinweise: P280 Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz tragen.

P303+P361+P353 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen.

P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

P310 Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM, Arzt anrufen.

P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.

**COENZYME****Coenzym - gebrauchsfertig**

Inhalt: S-adenosyl-L-methionine

Volumen: 1 x 4 mL/ Fläschchen, Deckel lila

**ENZYME****Enzym - lyophilisiert**

Inhalt: Catechol-O-methyltransferase

Volumen: 2 Fläschchen, Deckel rosa

Beschreibung: Catechol-O-Methyltransferase aus Schweineleber

**EXTRACT-BUFF****Extraktionspuffer - gebrauchsfertig**

Inhalt: Carbonatpuffer

Volumen: 1 x 6 mL/Fläschchen, Deckel braun

**EXTRACT-PLATE 48****Extraktionsplatte - gebrauchsfertig**

Inhalt: 2 x 48 Well Platte beschichtet mit Boronat-Affinitätsgel in einem wiederverschließbaren Beutel

**HCL****Hydrochloric Acid - gebrauchsfertig**

Inhalt: 0,025 M Salzsäure, gelb gefärbt

Volumen: 1 x 20 mL/ Fläschchen, Deckel grün

**Standards und Controls - Gebrauchsfertig**

Komponente	Deckel-farbe	Konzentration [ng/mL] NAD	Konzentration [nmol/L] NAD	Volumen/ Fläschchen
STANDARD A	weiß	0	0	4 mL
STANDARD B	gelb	5	30	4 mL
STANDARD C	orange	20	118	4 mL
STANDARD D	blau	75	443	4 mL
STANDARD E	grau	250	1478	4 mL
STANDARD F	schwarz	1000	5910	4 mL
CONTROL 1	grün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC Report angegeben.		4 mL
CONTROL 2	rot			4 mL

Umrechnung: Noradrenalin (ng/mL) x 5,91 = Noradrenalin (nmol/L)

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

**4.2 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien**

- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

#### 4.3 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 – 700 µL; 1 mL
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 - 650 nm-Filter zur Auswertung von Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Vortex-Mischer

### 5 PROBENSAMMLUNG, -BEHANDLUNG UND LAGERUNG

#### Plasma

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

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

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden.

Im Falle von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben siehe 2.2.1.

#### 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 zu notieren.

Lagerung: bis zu 48 Stunden bei 2 °C - 8 °C,  
bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur und  
für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben, sowie direktes Sonnenlicht sind zu vermeiden.

### 6 TESTDURCHFÜHRUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Extraktions- und Mikrotiterplatten müssen beschriftet werden (die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden). Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.

Die Bindung des Antikörpers, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassays liegt zwischen 20 °C - 25 °C.

**⚠** Der verwendete Mikrotiterplattenschüttler muss folgende Spezifikationen haben: Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm. Schütteln mit abweichenden Einstellungen kann die Ergebnisse beeinflussen.

#### 6.1 Vorbereitung der Reagenzien

##### Waschpuffer

20 mL **WASH-CONC 50X** mit Wasser auf ein Endvolumen von 1000 mL verdünnen.

Lagerung: 2 Monate bei 2 °C - 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!

##### Noradrenalin Mikrotiterstreifen

Vereinzelt können Rückstände der Blockier-und Stabilisierlösung in den Wells zu sehen sein (kleine weiße Punkte oder Linien). Diese stellen keine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes dar.

##### Azylierungsreagenz

Das **ACYL-REAG** hat einen Gefrierpunkt von 18,5 °C. Um sicher zu stellen, dass es bei Gebrauch flüssig ist, muss es vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden und danach eine homogene, kristallfreie Lösung bilden.

## 6.2 Probenvorbereitung, Extraktion und Azylierung

1. Jeweils **10 µL Standards, Kontrollen, Urinproben** und **300 µL Plasmaproben** in die entsprechenden Wells der **EXTRACT-PLATE 48** pipettieren.
2. **250 µL Wasser** (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in alle Wells der **Standards, Kontrollen und Urinproben** pipettieren.
3. Je **50 µL ASSAY-BUFF** in alle Wells pipettieren.
4. Je **50 µL EXTRACT-BUFF** in alle Kavitäten pipettieren.
5. **EXTRACT-PLATE 48** mit **FOILS** abdecken und für **30 min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) schütteln.
6. **FOILS** entfernen. Die **EXTRACT-PLATE 48** ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
7. **1 mL Waschpuffer** in alle Wells pipettieren. **5 min bei RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren. Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8. Ein weiteres Mal **1 mL Waschpuffer** in alle Wells pipettieren. **5 min bei RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren. Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
9. Je **150 µL ACYL-BUFF** in alle Wells pipettieren.
10. Je **25 µL ACYL-REAG** in alle Wells pipettieren.
11. **15 min bei RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
12. Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
13. **1 mL Waschpuffer** in alle Wells pipettieren. **10 min bei RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren. Platte ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
14. Je **150 µL HCL** in alle Wells pipettieren.
15. **EXTRACT-PLATE 48** mit **FOILS** abdecken und für **10 min** bei **RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) schütteln.



**Überstand anschließend nicht verwerfen bzw. Platte nicht ausleeren!**

Von den Extrakten werden für den nachfolgenden ELISA folgende Volumina benötigt:

<b>Noradrenalin</b>	<b>20 µL</b>
---------------------	--------------

## 6.3 Noradrenalin ELISA

1. **25 µL Enzymlösung** (siehe 6.1) in die entsprechenden Wells der **W NAD NMN** pipettieren.
2. Jeweils **20 µL** der extrahierten **Standards, Kontrollen und Proben** in die Wells pipettieren.
3. Für **30 min bei RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
4. **50 µL NAD-AS** in alle Wells pipettieren und Platte mit **FOILS** abdecken.
5. **2 Stunden bei RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
6. **FOILS** entfernen und den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells **3-mal** gründlich mit **300 µL Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
7. **100 µL CONJUGATE** in alle Wells pipettieren.
8. Für **30 min bei RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
9. Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells **3-mal** gründlich mit **300 µL Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
10. **100 µL SUBSTRATE** in alle Wells pipettieren und für **25 ± 5 min bei RT** (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren. **Direktes Sonnenlicht vermeiden!**
11. **100 µL STOP-SOLN** in alle Wells pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
12. **Absorption** mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei **450 nm** innerhalb von 10 Min **messen** (falls vorhanden, wird gegen eine Referenzwellenlänge zwischen 620 und 650 nm empfohlen).

## 7 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messbereich	Noradrenalin	
	Urin	2,5 – 1.000 ng/mL
	Plasma	93 – 33.333 pg/mL

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannten Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standardabsorptionen (Berechnung der mittleren Absorption, linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) mit einer Konzentration von 0,001 ng/mL für Standard A (diese Ausrichtung ist aufgrund der logarithmischen Darstellung der Daten erforderlich) erstellt. Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: 4-parameter, marquardt) verwendet.

 Dieser Assay ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die OD-Werte mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. OD Signale, die unterhalb 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 können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Berechnung der 24 Stunden Urinproben:  $\mu\text{g}/24 \text{ h} = \mu\text{g/L} \times \text{L}/24 \text{ h}$

### Plasmaproben

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

### Umrechnung

Noradrenalin [ng/mL]  $\times$  5.91 = Noradrenalin [nmol/L]

## 7.1 Erwartete Referenzwerte

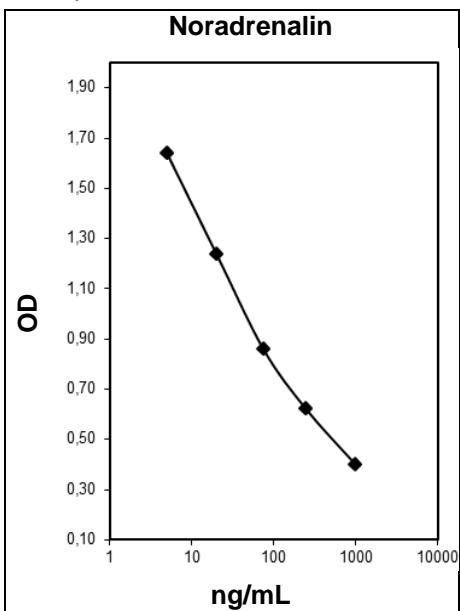
Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

Noradrenalin	
Sammelurin	< 90 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ (535 nmol/Tag)
Plasma	< 600 pg/mL

## 7.2 Typische Standardkurve



Beispiel: bitte nicht für die Auswertung verwenden!



## 8 KONTROLLPROBEN

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen Vorschriften zu verwenden. Verwenden Sie Kontrollen im normalen und pathologischen Bereich. Kommerzielle Kontrollproben müssen dabei wie die unbekannten Proben behandelt werden. Kontrollproben sollten innerhalb der festgelegten Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report angegeben.

## 9 TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität		
Noradrenalin		
Limit of Blank (LOB)	Urin [ng/ml]	1,5
	Plasma [pg/ml]	32
Limit of Detection (LOD)	Urin [ng/ml]	1,7
	Plasma [pg/ml]	36
Limit of Quantification (LOQ)	Urin [ng/ml]	2,5
	Plasma [pg/ml]	93

Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)	
Substanz	Kreuzreaktion [%]
	Noradrenalin
Derivatisiertes Adrenalin	0,08
Derivatisiertes Noradrenalin	100
Derivatisiertes Dopamin	0,03
Metanephrin	< 0,01
Normetanephrin	0,16
3-Methoxytyramin	< 0,01
3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol	< 0,01
Tyramin	< 0,01
Phenylalanin, Coffeinsäure, L-Dopa, Homovanillinsäure, Tyrosin, 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure	< 0,01

Präzision							
Intra-Assay Urin (n = 60)				Intra-Assay Plasma (n = 60)			
	Probe	Bereich (ng/mL)	CV (%)		Probe	Bereich (pg/mL)	CV (%)
Noradrenalin	1	26,1 ± 3,6	13,8	Noradrenalin	1	510 ± 65	12,8
	2	97 ± 12,8	13,4		2	1358 ± 194	14,3
	3	267 ± 35	13,1		3	3363 ± 374	11,1
Inter-Assay Urin (n = 33)				Inter-Assay Plasma (n = 18)			
	Probe	Bereich (ng/mL)	CV (%)		Probe	Bereich (pg/mL)	CV (%)
Noradrenalin	1	19,5 ± 3,9	20,0	Noradrenalin	1	445 ± 40,9	9,2
	2	80,6 ± 10,6	13,2		2	1232 ± 134	10,9
	3	226 ± 39,5	17,4		3	3283 ± 302	9,2

Linearität			Serielle Verdünnung bis	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	Noradrenalin	Urin	1:512	100 - 127	112
		Plasma	1:512	102 - 125	112

<b>Wiederfindung</b>			<b>Mittelwert (%)</b>	<b>Bereich (%)</b>	<b>Bereich</b>
	Noradrenalin	Urin	103	91 - 113	58,6 – 260 ng/mL
		Plasma	87	75 - 107	51 – 14251 pg/mL

## 10 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(-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)

**SYMBOLS USED**

<b>Symbol</b>	<b>English</b>	<b>Deutsch</b>	<b>Français</b>	<b>Español</b>	<b>Italiano</b>
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeits-datum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de micro-titration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stoplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Zero Standard	Estándar cero	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungs-medium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungs-medium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluente del tracciante