DIAGNOSTIKA GMBH

## Gebrauchsanweisung

# SDMA human ELISA

Enzymimmunoassay für die
Quantitative Bestimmung von
**Endogenem Symmetrischen Dimethyl-Arginin (SDMA)**
**in humanem Serum oder EDTA-Plasma**

CE IVD

| | |
|---|---|
| REF | EA214/96 |
| Σ | 12 x 8 |
| | 2 – 8 °C |

Wesamin GmbH & Co. KG • Graff 1 • 24568 Oersdorf • Germany
Distributor: DLD Diagnostika GmbH • Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Germany
Tel. +49 40 5558710 • Fax +49 40 55587111 • contact@dld-diagnostika.de • www.dld-diagnostika.de

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Testprinzip ..... 5
2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen ..... 6
3 Lagerung und Haltbarkeit ..... 7
4 Inhalt des Kits ..... 7
5 Probengewinnung ..... 9
6 Vorbereitung der Proben und Reagenzien ..... 9
7 Testdurchführung ..... 10
8 Testauswertung ..... 12
9 Testcharakteristika ..... 13
10 Literatur ..... 15
11 Änderungen ..... 15
Pipettierschema - Probenvorbereitung ..... 16
Pipettierschema - ELISA ..... 16

**Verwendete Symbole**

| | | | |
|---|---|---|---|
| IVD | In-Vitro Diagnostikum | CE | CE markiert |
| CONT | Inhalt | | Verwendbar bis |
| LOT | Chargenbezeichnung | | Temperaturbegrenzung |
| | Hersteller | | Inhalt austreichend für <n> Prüfungen |
| REF | Bestellnummer | | Gebrauchsanweisung beachten |

**Gefahrensymbole**

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Gefahr | | Achtung |

# 1 Einleitung und Testprinzip

Die exakte Bestimmung der Nierenfunktion ist aufgrund der Notwendigkeit einer Dosisanpassung zahlreicher Arzneistoffe bei eingeschränkter Nierenfunktion ein wichtiger Bestandteil der klinischen Beurteilung eines Patienten. Auch geringe Einschränkungen der Nierenfunktion gehen mit einer Steigerung des Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen einher. Da der meistverwendete Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion, die Serum-Kreatinin-Konzentration, bei geringen Einschränkungen der Nierenfunktion noch nicht ansteigt, besteht eine Notwendigkeit, sensitivere Marker der Nierenfunktion insbesondere bei geringgradiger Funktionseinschränkung anzubieten. SDMA ist ein methyliertes Derivat der Aminosäure L-Arginin (symmetrisches Dimethylarginin). SDMA wird ausschließlich durch renale Exkretion aus dem Körper eliminiert; daher ist die SDMA-Plasmakonzentration eng mit der Nierenfunktion korreliert. Somit bietet die Messung von SDMA eine Möglichkeit zur sensitiven Bestimmung renaler Funktionseinschränkungen, wie in mehreren klinischen Studien belegt werden konnte: In 18 klinischen Studien mit über 2.100 Patienten fand sich eine hochsignifikante Korrelation der SDMA-Plasmakonzentration mit der Inulin-Clearance bzw. mit verschiedenen Methoden der Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate.
Darüberhinaus gibt es Hinweise, dass erhöhte SDMA-Konzentrationen, wie sie z.B. bei eingeschränkter Nierenfunktion vorliegen können, auch unabhängig vom Grad der Nierenfunktionseinschränkung ein kardiovaskuläres Erkrankungsrisiko anzeigen.
Die bisher verfügbaren Messverfahren zur quantitativen Bestimmung von SDMA in Plasma, Serum, Urin und anderen biologischen Flüssigkeiten basierten allesamt auf dem chemischen Nachweisverfahren der Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (HPLC). Diese Methode ist jedoch sehr zeit- und personalintensiv, teuer, und somit für die klinische Routinediagnostik nicht geeignet. Der SDMA human ELISA bietet den Vorteil der spezifischen und sensitiven Erfassung dieses Markers mit Routine-Methoden und ist, was personellen und technischen Aufwand angeht, der HPLC-Messung überlegen.
Der SDMA human ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem SDMA in Plasma und Serum. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird SDMA durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-SDMA umgewandelt.

Der SDMA human ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. An die Festphase gebundenes und freies, in Lösung befindliches Antigen konkurrieren um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen.

Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex in einem Waschschritt entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines 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 des Antigens in der Probe.

## 2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur In-vitro Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Alle Reagenzien dieses Kits, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Kits 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 Kits enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in *4. Inhalt des Kits* 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. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6. geregelt.

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

## 4 Inhalt des Kits

**Mikrotiterstreifen** **STRIPS** 12 Stück

Je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit SDMA

**Standards (1 - 6)** **CAL 1 - 6** 6 Flaschen

Je 4 ml, gebrauchsfertig

| Standard | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| µmol/l | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,7 | 1,2 | 3 |
| ng/ml | 0 | 40 | 81 | 141 | 242 | 606 |

**Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2** 2 Flaschen

Je 4 ml gebrauchsfertig, Bereich: siehe QC-Zertifikat

**Acylierungsreagenz** **ACYL-REAG** 3 Flaschen

3 ml, lyoph., mit Solvent auflösen

**Acylierungspuffer** **ACYL-BUFF** 1 Flasche

3,5 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt

Achtung

**Solvent** **SOLVENT** 1 vial

10 ml gebrauchsfertig, enthält DMSO
(bitte beachten: Solvent greift Plastik an; Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen)

Gefahr

Achtung

**Antiserum** **AS** 1 Flasche
7 ml, gebrauchsfertig, Kaninchen-anti-N-Acyl-SDMA, gelb gefärbt

**Enzymkonjugat** **CONJ** 1 Flasche
13 ml, gebrauchsfertig,
Anti-Kaninchen IgG-POD Konjugat

**Waschpuffer** **WASH** 1 Flasche
20 ml, Konzentrat (50x)

**Substrat** **SUB** 1 Flasche
13 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig

**Stopplösung** **STOP** 1 Flasche
13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3M Schwefelsäure

**Reaktionsplatte** **ACYL-PLATE** 1 Stück
für die Acylierung

**Ausgleichsreagenz** **EQUA-REAG** 1 Flasche
Lyoph., mit 21 ml dest. Wasser lösen

**Folie** **FOIL** 2 Stück
gebrauchsfertig

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Rollmischer

# 5 Probengewinnung

Für den Test kann EDTA-Plasma und Serum eingesetzt werden.

Die Proben können bis zu 6 Stunden bei 2 – 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 18 Monate gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

# 6 Vorbereitung der Proben und Reagenzien

## 6.1 Mikrotiterstreifen

Mikrotiterstreifen STRIPS im geschlossenen Folienbeutel in etwa 10 Minuten auf Raumtemperatur bringen. Die nicht benötigten Mikrotiterstreifen dem Halterahmen entnehmen, wieder in den Beutel legen (das Trockenmittel im Beutel belassen) und diesen sorgfältig verschließen.

## 6.2 Ausgleichsreagenz

Inhalt des Fläschchens EQUA-REAG mit 21 ml destilliertem Wasser lösen, kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden. Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

## 6.3 Waschpuffer

Inhalt (20 ml) des Fläschchens WASH mit destilliertem Wasser auf 1.000 ml auffüllen, kurz mischen. Bei 2 – 8 °C gelagert, bleibt der verdünnte Waschpuffer bis zu 4 Wochen verwendbar. Wird das Kit in mehreren Ansätzen verwendet, empfehlen wir jeweils nur das dafür benötigte Volumen an Waschpuffer anzusetzen.

## 6.4 Acylierungs-Reagenz

Inhalt des Fläschchens ACYL-REAG mit 3 ml Solvent SOLVENT lösen und mindestens 10 Minuten auf den Rollenmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann mind. 3 Stunden stabil. Durch die 2. und 3. Flasche im Kit ist der ELISA in zwei oder drei Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt von zwei Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

**Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.**

# 7 Testdurchführung

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Reaktionsplatte markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

## 7.1 Probenvorbereitung (Acylierung)

1. 20 µl Standard 1 – 6 CAL 1 – 6 , Kontrolle 1 & 2 CON 1 & 2, Plasma und Serum in die entsprechenden Vertiefungen der Reaktionsplatte ACYL-PLATE pipettieren.
2. 20 µl Acylierungspuffer ACYL-BUFF in jede Vertiefung pipettieren.
3. 200 µl gelöstes Ausgleichsreagenz EQUA-REAG in jede Vertiefung pipettieren.
   Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
4. Bitte beachten: Acylierungsreagenz reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschälchen. Acylierungsreagenz reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.
   Bitte Multipetten oder Ähnliches verwenden, das Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und pipettieren.

   50 µl gelöstes Acylierungsreagenz ACYL-REAG in jede Vertiefung pipettieren und sofort mit Punkt 5. fortfahren. Farbe wechselt zu violett.
5. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

   25 µl der acylierten Proben im ELISA einsetzen.

## 7.2 Durchführung ELISA

1. 25 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen [STRIPS] pipettieren.
2. 50 µl Antiserum [AS] in jede Vertiefung pipettieren.
3. Platte mit Folie [FOIL] abkleben und 90 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünntem Waschpuffer [WASH] 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.
   Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
5. 100 µl Enzymkonjugat [CONJ] in jede Vertiefung pipettieren.
6. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. 100 µl Substrat [SUB] in jede Vertiefung pipettieren.
9. 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. 100 µl Stopplösung [STOP] in jede Vertiefung pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

## 8 Testauswertung

| Standard | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| µmol/l | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,7 | 1,2 | 3 |
| ng/ml | 0 | 40 | 81 | 141 | 242 | 606 |

Umrechnung: SDMA: 1 µmol/l = 202 ng/ml = 20,2 µg/dl

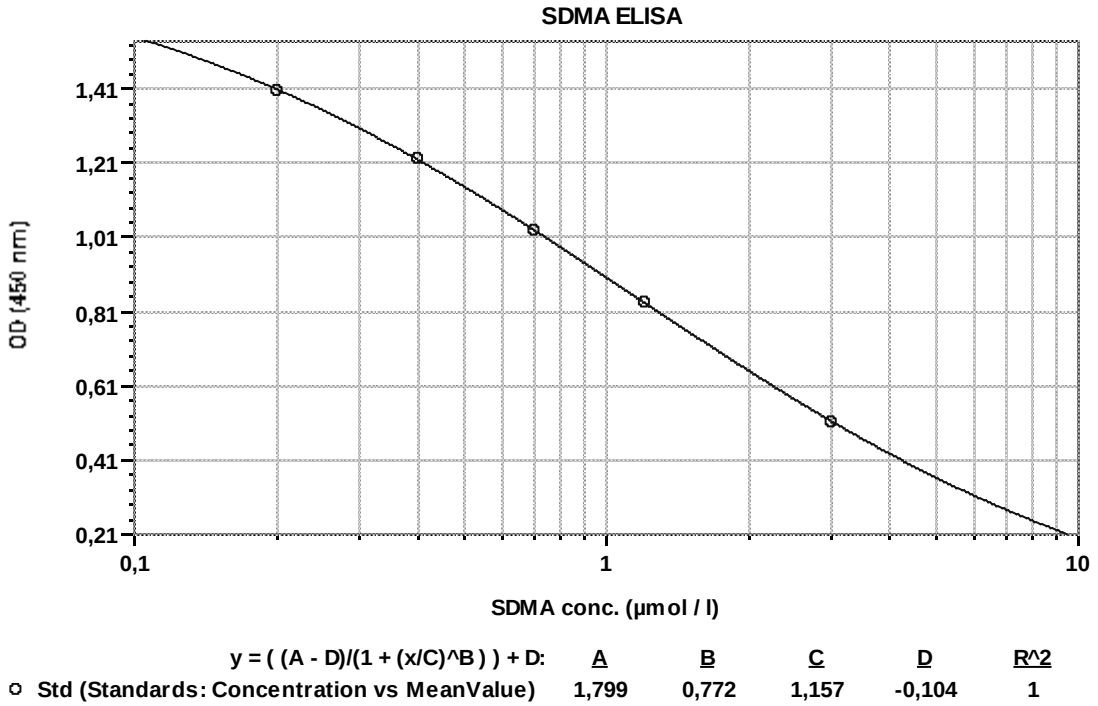
Die ODs (optische Dichten) der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen (Alternativ: Cubic-Spline oder Logit-Log).

Die Konzentrationen der Kontrollen und Proben können direkt aus der

Standardkurve in µmol / l abgelesen werden.

Die Abbildung zeigt ein typisches Beispiel:




**Qualitätskontrolle:** Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des Qualitätskontrollzertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.

# 9 Testcharakteristika

## 9.1 Referenzbereiche

Der angegebene Referenzbereich gilt lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

| Matrix | Referenzbereich |
|---|---|
| Humanes Serum, EDTA-Plasma, | 0,30 – 0,75 µmol / l |

## 9.2 Sensitivität

| Untere Nachweisgrenze | Berechnung |
|---|---|
| 0,03 µmol / l | $OD_{Cal1}$ – 3 x SD |

## 9.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

| Substanz | Kreuzreaktivität (%) |
|---|---|
| SDMA | 100 |
| ADMA | 0,74 |
| Monomethylarginin (NMMA) | 0,76 |
| Homoarginin | 0,04 |
| Arginin | 0,01 |

## 9.4 Wiederfindung nach Spiken

| Matrix | Bereich (µmol / l) | Mittelwert (%) | Bereich (%) |
|---|---|---|---|
| EDTA-Plasma | 0,43 – 1,44 | 97 | 86 - 104 |
| Serum | 0,45 – 1,72 | 93 | 88 - 102 |

## 9.5 Linearität

| Matrix | Bereich (µmol / l) | Höchste Verd. | Mittelwert (%) | Bereich (%) |
|---|---|---|---|---|
| EDTA-Plasma | 0,23 – 1,72 | 1 : 6 mit Wasser | 97 | 89 - 105 |

## 9.6 Reproduzierbarkeit

| Matrix | Bereich (µmol / l) | Intra-Assay-Vk |
|---|---|---|
| EDTA-Plasma | 0,52 – 0,82 | 6,2 – 4,9 % |

| Matrix | Bereich (µmol / l) | Inter-Assay-Vk |
|---|---|---|
| EDTA-Plasma | 0,52 – 1,21 | 2,0 – 8,8 % |

## 9.7 Methodenvergleich

| Matrix | Vergleichsmethode | Korrelation |
|---|---|---|
| Serum + Plasma | LC/MS | Y = 0,96 x LC/MS + 0,05; R = 0,987; N = 32 |

## 9.8 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Vergleich mit dem Referenzbereich (9.1) und dem Methodenvergleich (9.7) festgestellt.

## 9.9 Grenzen der Methode

Das Ergebnis des SDMA 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 Wasser (s. 9.5 Linearität) verdünnt und erneut bestimmt werden.

## 9.10 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

## 10 Literatur


- Bode-Böger S.M., Scalera F., Kielstein J.T., Martens-Lobenhoffer J., Breithardt G., Fobker M., Reinecke H.
  **Symmetrical Dimethylarginine: A new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease**
  J. Am. Soc. Nephrol. (2006) **17**: 1128-1134

- Kielstein J.T., Salpeter S.R., Bode-Böger S.M., Cooke J.P., Fliser D.
  **Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function – a meta-analysis**
  Nephrol. Dial. Transplant (2006) **21**: 2446 - 2451

- Wanby P., Teerlink T., Brudin L., Brattström L., Nilsson I., Palmqvist P., Carlsson M.
  **Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a risk marker for stroke and TIA in a Swedish population**
  Atherosclerosis (2006) 185: 271 – 277


## 11 Änderungen

Version _6: Ergänzungen bzw. Umformulierungen sind in grau hervorgehoben.

Version _5: Die Arbeitsanleitung wurde neu formatiert. Die Hersteller- und Distributorangaben wurden geändert. Abschnitte 6 und 7 und die Pipettierschemata wurde um die Komponentenbezeichnung laut Etikett ergänzt, um die Zuordnung zu erleichtern. Die Pipettierschemata wurden überarbeitet. Es wurden keine Änderungen an den Komponenten oder an der Durchführung selbst vorgenommen.

## Pipettierschema - Probenvorbereitung

| | | Standards | Kontrollen | Plasma | Serum |
|---|---|---|---|---|---|
| ACYL-PLATE: | | | | | |
| CAL 1 - 6 | µl | 20 | | | |
| CON 1 & 2 | µl | | 20 | | |
| EDTA-Plasma | µl | | | 20 | |
| Serum | µl | | | | 20 |
| ACYL-BUFF | µl | 20 | 20 | 20 | 20 |
| EQUA-REAG | µl | 200 | 200 | 200 | 200 |

Platte 10 Sekunden schütteln

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ACYL-REAG (frisch) | µl | 50 | 50 | 50 | 50 |

Sofort 20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln
Je 25 µl im ELISA einsetzen

## Pipettierschema - ELISA

| | | Acyl. Standards | Acyl. Kontrollen | Acyl. Proben |
|---|---|---|---|---|
| STRIPS: | | | | |
| Transfer von ACYL-PLATE in STRIPS | µl | 25 | 25 | 25 |
| AS | µl | 50 | 50 | 50 |

Platte mit FOIL abkleben
90 Minuten bei Raumtemperatur schütteln
4 x Waschen (ca. 300 µl WASH pro Vertiefung)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| CONJ | µl | 100 | 100 | 100 |

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln
4 x Waschen (ca. 300 µl WASH pro Vertiefung)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| SUB | µl | 100 | 100 | 100 |

25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| STOP | µl | 100 | 100 | 100 |

Messung der Extinktion bei 450 nm (Ref. 570 - 650 nm)