

Arbeitsanleitung / Manual

SDMA ELISA Kit

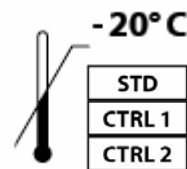
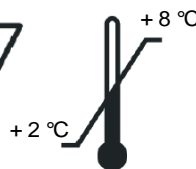
Zur Bestimmung von SDMA in humanem EDTA-Plasma und Serum

For the determination of SDMA in human EDTA-plasma and serum

Gültig ab / Valid from 08.12.2009



K 7780



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	6
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	6
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	8
<i>PIPETTIERSCHEMA PROBENVORBEREITUNG</i>	8
<i>PIPETTIERSCHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i>	9
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	11
<i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i>	11
11. TESTCHARAKTERISTIKA	13
<i>KREUZREAKTION</i>	13
<i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i>	13
<i>SENSITIVITÄT</i>	13
<i>WIEDERFINDUNG</i>	14
<i>LINEARITÄT</i>	14
12. EINSCHRÄNKUNGEN	14
13. LITERATUR	15
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	15

1. INTENDED USE	18
2. INTRODUCTION	18
3. PRINCIPLE OF THE TEST	19
4. MATERIAL SUPPLIED	20
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	21
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	21
7. PRECAUTIONS	22
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	23
9. ASSAY PROCEDURE	23
<i>SAMPLE PREPARATION PROCEDURE</i>	23
<i>TEST PROCEDURE</i>	24
10. EVALUATION OF RESULTS	26
<i>EXPECTED VALUES</i>	26
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	28
<i>CROSS REACTIVITY</i>	28
<i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i>	28
<i>SENSITIVITY</i>	28
<i>RECOVERY</i>	29
<i>LINEARITY</i>	29
12. LIMITATIONS	29
13. REFERENCES	30
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	30

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA Test ist für die Bestimmung von symmetrischem Dimethyl-Arginin (SDMA) in humanem EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

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 die Notwendigkeit, sensitivere Marker der Nierenfunktion insbesondere bei geringgradiger Funktionseinschränkung anzubieten.

SDMA ist ein methyliertes Derivat der Aminosäure L-Arginin. SDMA wird ausschließlich durch renale Exkretion aus dem Körper eliminiert; daher korreliert die SDMA-Plasmakonzentration eng mit der Nierenfunktion. 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 2136 Patienten fand sich eine hochsignifikante Korrelation der SDMA-Plasmakonzentration mit der Inulin-Clearance bzw. mit verschiedenen Methoden der Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate.

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass erhöhte SDMA-Konzentrationen, mit der erhöhten Wahrscheinlichkeit eines sequenziellen Organversagens für Niere und Leber sowie einem erhöhten kardiovaskulären Risiko korrelieren.

Indikation

- Niereninsuffizienz
- Kardiovaskuläres Risiko bei Renaler Dysfunktion
- Hypertonie bei Renaler Dysfunktion

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Kopplung des enthaltenen SDMA versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe mit einem polyklonalen SDMA-Antiserum in einer mit SDMA-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Antikörper aus der Bindung an den Tracer. Daher ist die Konzentration des an den Tracer gebundenen Antikörpers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Sekundäantikörper zugegeben, der an die polyklonalen Anti-SDMA-Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidase-substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender Konzentration von SDMA in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Biotintracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K7780MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K7780ST	STD	Standards vorverdünnt in Reaktionspuffer	6 x 1 Fläschchen
K7780KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen vorverdünnt in Reaktionspuffer	2 x 1 Fläschchen
K7780WP	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat (10-fach)	2 x 100 ml
K7780AK	AB	SDMA-Antikörper (lyophilisiert)	1 Reaktionsgefäß
K7780K	2.AB	POD-Antikörper (Konzentrat)	120 µl
K7780CSP	2.ABDIL	Konjugatstabilisierungspuffer	24 ml
K7780RP	DERBUF	Reaktionspuffer	15 ml
K7780DR	DER	Derivatisierungsreagenz	2 x 50 mg
K7780LM	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	7 ml
K7780SL	CODIL	Verdünnungspuffer für Kopplung	28 ml
K7780TMB	SUB	TMB-Substrat	25 ml
K7780AC	STOP	Stopplösung	15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 10000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so je nach Probenaufkommen bis zu 2 x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL1, CTRL2)** sind bereits in **Reaktionspuffer (DERBUF)** verdünnt und werden bei -20°C gelagert. Für den Test werden die Standards und Kontrollen aufgetaut und können bis zu 3 mal wieder eingefroren werden. Das Wiedereinfrieren der Standards und Kontrollen sollte sofort nach Entnahme erfolgen.

- **DMSO** kristallisiert bei 4°C aus. Zum Lösen das DMSO im Wasserbad bei 20-25°C erwärmen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER) (50 mg)** wird in **3 ml DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Durch die Aufteilung des DER in 2 Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Bitte beachten: **DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.**
- Der **SDMA-Antikörper (AB)** wird in **11,2 ml verdünntem Waschpuffer** gelöst. Hierzu wird der Inhalt des AB-Gefäßes zunächst mit 1,2 ml verdünntem Waschpuffer 5 min gelöst. Diese Lösung wird anschließend vollständig in ein separates Gefäß überführt und mit 10 ml verdünntem Waschpuffer aufgefüllt. **Verdünnter SDMA-Antikörper (AB) ist stabil und kann 4 Wochen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.**
- Der **POD-Antikörper (2.AB)** wird **1:200** in **Konjugatstabilisierungspuffer (2.ABDIL)** verdünnt (110 µl 2.AB + 22 ml 2.ABDIL). Unverdünnter POD-Antikörper (2.AB) ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünnter POD-Antikörper (2.AB) ist bedingt stabil und kann 5 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei 2-8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Standards und Kontrollen sind auf Humanplasma aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H₂SO₄. H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht verwendet werden. H₂SO₄ verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

EDTA-Plasma und Serum

- Als Probe eignet sich venöses Nüchternblut. Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2-8°C eine Woche. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei – 20°C aufbewahrt werden.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- **EDTA-Plasma- und Serumproben** werden unverdünnt verwendet.*

*Falls weniger als 50 µl Probe vorhanden ist, empfehlen wir eine 1:1 Verdünnung in DERBUF (Reaktionspuffer) (25 µl Probe + 25 µl DERBUF). Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Proben mit sichtbaren Mengen an **Feststoff** (meist Kryoproteine) sollten vor Einsatz mind. 5 min bei 10000 x g **zentrifugiert** werden. Der resultierende Überstand wird im Test eingesetzt.

- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem **DER** (Derivatisierungsreagenz) zur Kopplung des enthaltenen SDMA versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettierolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik AG übernimmt keine Haftung.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Pipettierschema Probenvorbereitung

Die Kopplung der Standards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der Proben (SAMPLE) wird als Einzelbestimmung in Mikroreaktionsgefäßen durchgeführt.

1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen

2. Je **200 µl gebrauchsfertiger Standard (STD)** bzw. **200 µl gebrauchsfertige Kontrollen (CTRL)** bzw. **50 µl Probe (SAMPLE)** in Mikroreaktionsgefäße pipettieren
3. **150 µl Reaktionspuffer (DERBUF)** nur zu den **Proben (SAMPLE)** in den Reaktionsgefäßen pipettieren
4. **50 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in **alle Reaktionsgefäße** (Standards, Kontrollen und Proben) pipettieren, gut mischen und **sofort** auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min bei Raumtemperatur (18-26°C)** inkubieren
5. Anschließend in alle verwendeten Mikroreaktionsgefäße **250 µl Verdünnungspuffer (CODIL)** zugeben, gut mischen und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **45 min bei Raumtemperatur (18-26°C)** inkubieren

2 x 100 µl der so vorbereiteten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

6. Positionen für Standard/Kontrolle /Probe (STD/CTRL/SAMPLE) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren
7. Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden
8. Mikrotiterplattenstreifen **5x mit je 250 µl** verdünntem **Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
9. **2 x 100 µl der vorbereiteten derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** werden aus den Mikroreaktionsgefäßen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte (PLATE) pipettiert

10. 100 µl verdünnter SDMA-AK (AB) pro Vertiefung pipettieren. Streifen luftdicht abdecken
11. Über Nacht (15-20 Stunden) bei 2-8°C inkubieren
12. Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von WASHBUF durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
13. 200 µl verdünnten POD-AK (2. AB) in alle Vertiefungen pipettieren
14. Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren
15. Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von WASHBUF durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
16. 200 µl TMB-Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren
17. 8-12 min bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
18. 100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen
19. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (alternativ 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden

*Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Bei einer Durchführung des Tests unter strikter Einhaltung der Volumenangaben für Standards, Kontrollen und Probenbehandlung sind Standards, Kontrollen sowie Proben gleich verdünnt, deshalb wird **bei der Auswertung der Ergebnisse kein Verdünnungsfaktor mit berechnet.****

**Bei einer 1:1 Verdünnung muss der Verdünnungsfaktor mit berechnet werden.

Auswertungsfunktionen

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, wir empfehlen 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Erwartete Ergebnisse

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (**n=40**) wurde ein Mittelwert von 0,47 µmol/l ermittelt, bei der Standardabweichung von 0,07 µmol/l.

Normalbereich:

Serum/Plasma Mittelwert \pm 2 Standardabweichungen: $0,47 \pm 0,14$ µmol/l

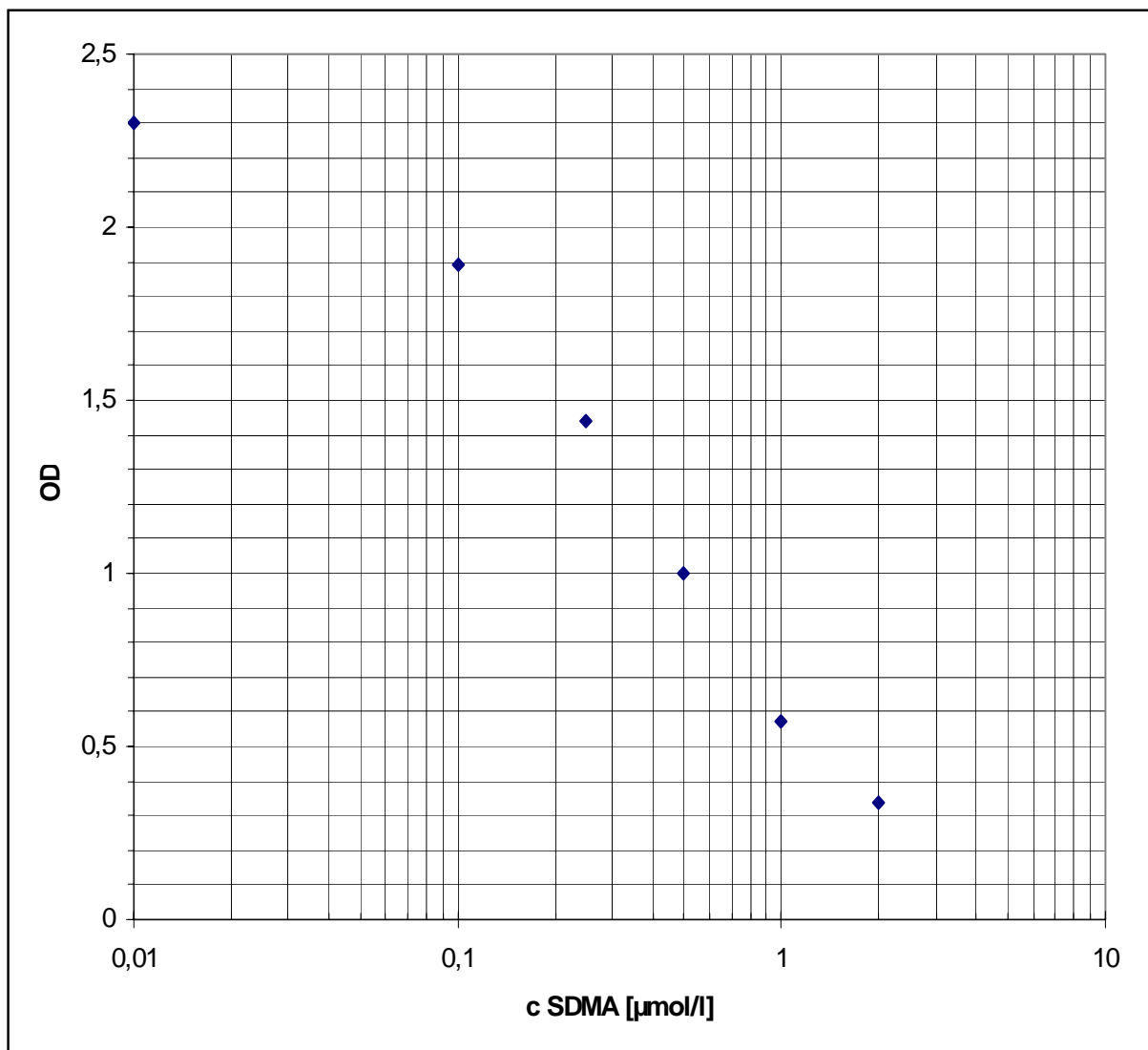
Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Testansatz Kontrollen mitgeführt werden. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen ein oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

Die Konzentrationen der Kontrollen und Patientenproben können direkt aus der Kalibrierkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.

Musterkalibrierkurve



11. TESTCHARAKTERISTIKA

Kreuzreaktion

ADMA < 0,5 %

NMMA < 0,5 %

L-Arginin < 0,02 %

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=12)		
Probe	SDMA [$\mu\text{mol/l}$]	Standardabweichung (SD) [%]
1	0,27	7,5
2	0,67	4,8

Inter-Assay (n=6)		
Probe	SDMA [$\mu\text{mol/l}$]	Standardabweichung (SD) [%]
1	0,22	6
2	0,63	7

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 2 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 20-mal der Standard Null.

Probe	SDMA Mittelwert [OD]	2 Standard- abweichungen (2 x SD) [%]	Nachweis- grenze [$\mu\text{mol/l}$]
Standard Null	2,3	0,05	0,05

Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an SDMA wurden zu einer Serumprobe gegeben (Spike) und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von SDMA wurde bei 2 verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die theoretisch erwarteten Werte wurden dabei aus der Summe der gemessenen Konzentration in der Probe ohne Spike und der zugegebenen Menge ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Serumprobe betrug 101 % (n=6).

Spike [$\mu\text{mol/l}$]	SDMA erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	SDMA gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
0	x	x=0,75	100
0,5	0,5+x=1,25	1,26	101
1	1,0+x=1,75	1,79	102

Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 95 %.

Verdünnung	Erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	Messwert [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
original	1,75	1,75	100
1+1	0,88	0,85	96
1+3	0,44	0,37	90

12. EINSCHRÄNKUNGEN

Stark hämolytische oder lipämische Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Wir empfehlen solche Proben nicht zu analysieren.

13. LITERATUR

1. Fleck C., Schweitzer F., Karge E., Busch M., Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clinical Chimica Acta* (2003) 336: 1 - 12
2. D'Apollito O., Paglia G., Tricarico F., Garofalo D., Pilotti A., Lamacchia O., Cignarelli M., Corso G. Development and validation of a fast quantitative method for plasma dimethylarginines analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* (2008) 41: 1391 - 1395
3. 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
4. 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

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden (Haltbarkeitsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immunodiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

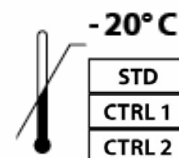
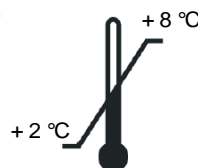
SDMA ELISA Kit

For the determination of SDMA in human EDTA-plasma and serum

Valid from 08.12.2009



K 7780



1. INTENDED USE

The SDMA ELISA Kit is intended for the quantitative determination of symmetric dimethylarginine (SDMA) in human EDTA-plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

The dosage of most drugs must be adapted in renal insufficiency, making accurate assessment of renal function a prerequisite in clinical medicine. Furthermore, even a modest decline in renal function has been recognized as a cardiovascular risk.

In clinical practice serum creatinine is typically used to assess renal function, but this serum creatinine does not increase at modest decline in renal function. Consequently, there is an ongoing search for suitable endogenous markers of renal function.

SDMA is a methylated derivative of L-Arginine which is strictly eliminated by renal extraction, thus SDMA plasma level is strongly correlated to renal function. In 18 studies with more than 2136 patients systemic SDMA concentrations correlated highly with inulin clearance, as well as with various clearance estimates combined and serum creatinine. With respect to this SDMA exhibits properties of a reliable marker of renal dysfunction.

Moreover, there are hints that increased SDMA correlates with total sequential organ failure indicating both renal and hepatic failure and an increased cardiovascular risk.

Indication

- Renal failure
- Cardiovascular risk in renal dysfunction
- Hypertension in renal dysfunction

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. The sample preparation includes the addition of an derivatization-reagent for SDMA coupling. Afterwards, the treated samples and the polyclonal SDMA-antiserum are incubated in wells of microplate coated with SDMA-derivative (tracer). During the incubation period, the target SDMA in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. The SDMA in the sample displaces the antibodies out of the binding to the tracer. Therefore the concentration of the tracer-bound antibody is inverse proportional to the SDMA concentration in the sample. During the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect the anti-SDMA antibodies. After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a substrate for peroxidase. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the SDMA concentration in the sample; this means high SDMA concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibodies and lowers the photometric signal.

A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard. SDMA present in the patient samples is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Content	Kit Components	Quantity
K7780MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K7780ST	STD	Standards (diluted in reaction buffer)	6 x 1 vial
K7780KO	CTRL 1 CTRL 2	Controls (diluted in reaction buffer)	2 x 1 vial
K7780WP	WASHBUF	Wash buffer concentrate (10 fold)	2 x 100 ml
K7780AK	AB	SDMA antibody (lyophilized)	1 vial
K7780K	2.AB	POD antibody (concentrate)	120 µl
K7780CSP	2.ABDIL	Conjugate stabilizing buffer	24 ml
K7780RP	DERBUF	Reaction buffer	15 ml
K7780DR	DER	Derivatization reagent	2 x 50 mg
K7780LM	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	7 ml
K7780SL	CODIL	Dilution buffer for coupling	28 ml
K7780TMB	SUB	TMB substrate	25 ml
K7780AC	STOP	Stop solution	15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidist.)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 μ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 10000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 2 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 μ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **Wash buffer concentrate (WASHBUF)** should be diluted with aqua bidist. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidist.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- **Standards (STD) and Controls (CTRL1, CTRL2)** are already diluted in the **reaction buffer (DERBUF)**. Store Standards and Controls frozen at -20°C, thaw before use in the test, and re-freeze immediately after use. Standards and Controls can be re-frozen up to 3 times.

- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at 20-25°C in a water bath.
- The content of one vial of **derivatization reagent (DER) (50 mg)** must be dissolved in **3 ml DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. After use, the rest of the reagent should be discarded. DER must be **prepared immediately before use**. The ELISA kit can be separated into two performances by the two DER vials. Please note: **DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass**.
- The **SDMA antibody (AB)** must be dissolved in **11.2 ml of diluted wash buffer**. Therefore, as first, the content of the AB vial must be reconstituted with 1.2 ml of diluted wash buffer for 5 minutes. Then the obtained AB solution is quantitatively transferred into a separate vial and 10 ml of diluted wash buffer is added. **Diluted SDMA antibody (AB) is stable over a longer period of time. It can be stored at 2-8°C for 4 weeks**.
- The **POD antibody (2.AB)** must be diluted **1:200** in **conjugate stabilizing buffer (2.ABDIL)** (110 µl 2.AB + 22 ml 2.ABDIL). The undiluted POD antibody (2.AB) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted POD antibody (2.AB) is not stable over a longer period. It can be stored at 2-8°C for only 5 days**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at 2-8°C.

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV and Hepatitis B. However, for safety reasons, all kit components should be treated as if potentially infectious.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-plasma and serum

- Venous fasting blood is suited for this test system. Samples are stable for one week at 2-8°C. For longer storage samples should be frozen at -20°C up to the measurement.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- The **EDTA-plasma and serum** samples are analyzed without any dilution.*

*If the sample volume is less than 50 µl, a 1:1 dilution in DERBUF (reaction buffer) is recommended (25 µl sample + 25 µl DERBUF). This dilution factor should be considered for data evaluation.

Samples with visible amounts of **precipitates** should be **centrifuged** at least for 5 min at 10000 x g. The resulting supernatant is used in the assay.

- For sample preparation, a DER for coupling of SDMA is added (details are given in the sample preparation procedure).

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from this.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

Sample preparation procedure

Coupling of standards (STD), controls (CTRL) and samples (SAMPLE) are carried out in single analysis.

- | | |
|----|--|
| 1. | Bring all reagents and samples to room temperature (18-26°C) |
| 2. | Add 200 µl of ready to use standards (STD) , 200 µl of ready to use controls (CTRL) and 50 µl of samples (SAMPLE) in the corresponding vial |

3.	Add 150 µl of reaction buffer (DERBUF) only to the samples (SAMPLE)
4.	Add 50 µl of freshly prepared derivatization reagent (DER) into each vial (standards, controls and samples), mix well and incubate for 45 min on a shaker (180-240 rpm) at room temperature (18-26°C)
5.	Afterwards add 250 µl of dilution buffer (CODIL) into each vial, mix well and incubate for 45 min on a shaker (180-240 rpm) at room temperature (18-26°C)

2 x 100 µl of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE) are used in the ELISA in duplicate.

Test procedure

6.	Mark the positions of standards (STD)/controls (CTRL)/ samples (SAMPLE) in duplicate on a protocol sheet
7.	Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
8.	Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate (PLATE) should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
9.	For the analysis in duplicate, take 2 x 100 µl of standard (STD)/control (CTRL)/samples (SAMPLE) out of the vial and add into the respective well of the microtiter plate (PLATE)
10.	Add 100 µl diluted SDMA antibody (AB) into each well. Cover the plate tightly

11.	Incubate overnight (15-20 hours) at 2-8°C
12.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate (PLATE) should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
13.	Add 200 µl diluted POD antibody (2. AB) into each well
14.	Cover plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal shaker (180-240 rpm)
15.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate (PLATE) should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
16.	Add 200 µl of TMB substrate (SUB) into each well
17.	Incubate for 8-12 min at room temperature (18-26°C) in the dark*
18.	Add 100 µl of stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly
19.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference

*The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

10. EVALUATION OF RESULTS

If the test is performed in strict compliance with the manufacturer's instructions, e.g. with the exact volumes for standards, controls and samples/sample treatment, standards, controls and samples are equally diluted. Therefore, **no dilution factor is required for calculation of the results.****

**At a 1:1 dilution, the dilution factor should be considered.

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Expected values

Based on internal studies of evidently healthy persons (**n=40**) a mean value of 0,47 $\mu\text{mol/l}$ was estimated. The standard variation was 0,07 $\mu\text{mol/l}$.

Normal range: Serum/Plasma mean value \pm 2 standard variation: 0,47 \pm 0,14 $\mu\text{mol/l}$

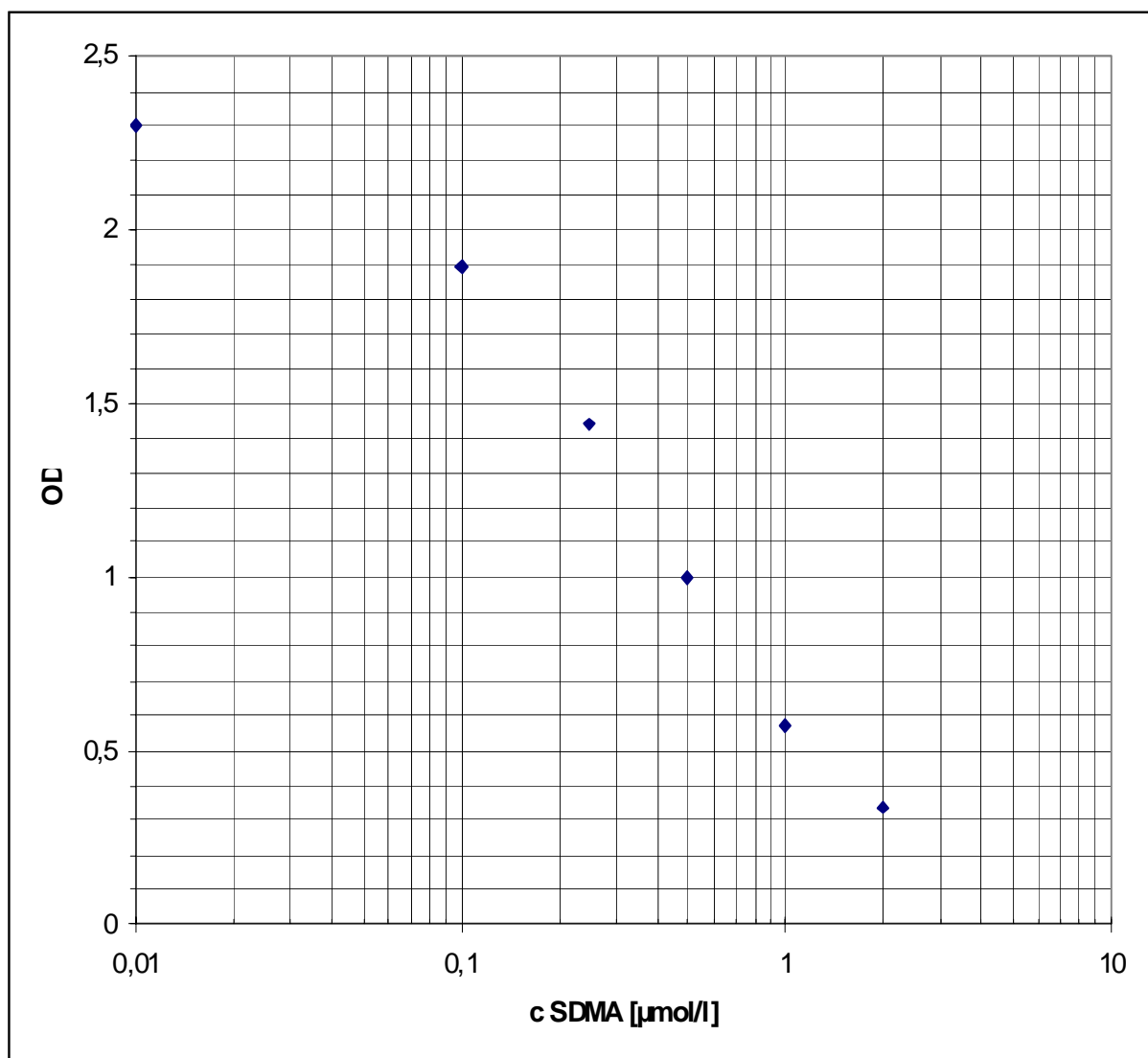
We recommend each laboratory to develop its own normal range. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

Controls

Control samples or serum pools should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of the control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

The concentration of controls and patient samples can be determined directly from calibration curve. In the following an example of a calibration curve is given.

Example of calibration curve



11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Cross reactivity

ADMA < 0,5 %

NMMA < 0,5 %

L-Arginine < 0,02 %

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=12)		
Sample	SDMA [$\mu\text{mol/l}$]	Standard variation (SD) [%]
1	0,27	7,5
2	0,67	4,8

Inter-Assay (n=6)		
Sample	SDMA [$\mu\text{mol/l}$]	Standard variation (SD) [%]
1	0,22	6
2	0,63	7

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2SD$. The zero-standard was measured 6 times.

Sample	SDMA mean value [OD]	Standard variation (2 x SD) [%]	Detection limit [$\mu\text{mol/l}$]
0	2,3	0,05	0,05

Recovery

One sample was spiked with different SDMA concentrations and measured using this assay. The analytical recovery rate was determined by the expected and measured SDMA levels. The expected levels were calculated as the sum of the measured SDMA concentration in the original sample and the spiked SDMA amount. The mean recovery rate for all concentrations was 101 % (n=6).

Spike [$\mu\text{mol/l}$]	SDMA expected [$\mu\text{mol/l}$]	SDMA measured [$\mu\text{mol/l}$]	Recovery [%]
0	x	x=0,75	100
0,5	0,5+x=1,25	1,26	101
1	1,0+x=1,75	1,79	102

Linearity

The linearity of the ELISA was determined by the dilution of a spiked patient sample. The mean linearity was 95%.

Dilution	Expected [$\mu\text{mol/l}$]	Measured [$\mu\text{mol/l}$]	Recovery [%]
original	1,75	1,75	100
1+1	0,88	0,85	96
1+3	0,44	0,37	90

12. LIMITATIONS

Strong hemolytic and lipemic samples often show wrong concentrations. Do not to measure hemolytic and lipemic samples.

13. REFERENCES

1. Fleck C., Schweitzer F., Karge E., Busch M., Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clinical Chimica Acta* (2003) 336: 1 - 12
2. D'Apollito O., Paglia G., Tricarico F., Garofalo D., Pilotti A., Lamacchia O., Cignarelli M., Corso G. Development and validation of a fast quantitative method for plasma dimethylarginines analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* (2008) 41: 1391 - 1395
3. 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
4. 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

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number