



Gebrauchsanweisung

ADMA Fast ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
endogenem asymmetrischen Dimethyl-Arginin (ADMA)
in humanem Serum und EDTA - Plasma

Nur für Forschungszwecke

RUO

REF AFE00

 96

 2 – 8 °C



WESAMIN GmbH & Co.KG /
Gesellschaft für die Entwicklung und Produktion von diagnostischen Artikeln mbH
Graff 1 • 24568 Oersdorf • Tel 04191-722 68 65 • Fax 04191-722 68 67
E-Mail: kontakt@wesamin.de • Internet: www.wesamin.de

Verwendete Symbole

 Forschungszwecke

 Inhalt

 Chargenbezeichnung

 Hersteller

 Bestellnummer

 Verwendbar bis

 Temperaturbegrenzung

 Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

 Gebrauchsanweisung beachten

Die Symbole der Komponenten des Kits sind in Kapitel 4 ***Inhalt des Testkits*** beschrieben.

1. Testprinzip

Der ADMA Fast ELISA Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem ADMA (asymmetrisches Dimethyl-Arginin) in humanem Serum oder EDTA-Plasma. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird ADMA durch das Acylierungs-Reagenz quantitativ in N-Acyl-ADMA umgewandelt.

Der ADMA Fast 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 Waschschrift entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugats nachgewiesen und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Die TMB/POD-Reaktion wird gestoppt und bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.

2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testkits sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testkits enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in *4. Inhalt des Testkits* 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.
- Zerbrochenes Glas kann zu Verletzungen führen. Vorsicht bei Glasgefäßen.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur geliefert und ist anschließend 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.

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

4. Inhalt des Testkits

4.1	MT-Streifen Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit ADMA	STRIPS	12 Stück
4.2	Standards 1 - 6 Je 4 ml, gebrauchsfertig	CAL 1 – 6	6 Fläschchen
4.3	Kontrolle 1 & 2 Je 4 ml, gebrauchsfertig Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat im Kit	CON 1 & 2	2 Fläschchen
4.4	Acylierungspuffer 3,5 ml, gebrauchsfertig blau eingefärbt	ACYL-BUFF	1 Fläschchen
		 Achtung	
4.5	Acylierungs-Reagenz lyophilisiert, Inhalt eines Fläschchens mit 3 ml Solvent lösen und gegebenenfalls vereinigen (s. auch 6.)	ACYL-REAG	3 Fläschchen
4.6	Antiserum ADMA 7 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt, blau gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acyl-ADMA	AS	1 Fläschchen
		 Achtung	

4.7	Enzymkonjugat 13 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ	 Achtung	1 Fläschchen
4.8	Waschpuffer 20 ml, Konzentrat (50x)	WASH		1 Fläschchen
4.9	Substrat 13 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	SUB		1 Fläschchen
4.10	Stopplösung 13 ml, gebrauchsfertig enthält 0,3 M Schwefelsäure	STOP		1 Fläschchen
4.11	Reaktionsplatte für die Acylierung	ACYL-PLATE		1 Stück
4.12	Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit 21 ml dest. Wasser lösen vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden (s. auch 6.)	EQUA-REAG		1 Fläschchen
4.13	Solvent 10 ml, gebrauchsfertig, enthält DMSO (bitte beachten: Solvent greift Plastik an; Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen)	SOLVENT	 Gefahr  Achtung	1 Fläschchen
4.14	Haftklebefolie gebrauchsfertig	FOIL		2 Stück

Zusätzliches Material (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 25, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 nm)
- Horizontal-Schüttler
- Vortex-Mischer
- Rollenmischer
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr

5. Probengewinnung und -lagerung

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Plasma und Serum

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.

6. Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

6.1 Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG**

Inhalt des Fläschchens mit 21 ml destilliertem Wasser lösen, kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler bis zum vollständigen Lösen mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

6.2 Waschpuffer

Inhalt (20 ml) des Waschpufferkonzentrates (50x) **WASH** mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar. Wird der Kit in mehreren Ansätzen verwendet, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

6.3 Acylierungs-Reagenz **ACYL-REAG**

Benötigte Fläschchen Acylierungs-Reagenz dem Folienbeutel entnehmen, die übrigen Fläschchen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen. Zur Rekonstitution des lyophilisierten Acylierungs-Reagenzes den Inhalt des Fläschchens mit 3 ml Solvent **SOLVENT** lösen und mindestens 10 Minuten auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungs-Reagenz 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

Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Reaktionsplatte markieren (Edding) und nur 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 alle Vertiefungen pipettieren.
3. **200 µl gelöstes Ausgleichsreagenz** EQUA-REAG in alle Vertiefungen pipettieren. Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz schütteln.
4. Bitte beachten: Acylierungs-Reagenz reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschälchen. Acylierungs-Reagenz reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.
Bitte Multipetten oder Ähnliches verwenden, das Acylierungs-Reagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und pipettieren.

50 µl gelöstes Acylierungs-Reagenz ACYL-REAG in alle Vertiefungen pipettieren und sofort mit dem nächsten Punkt fortfahren. Farbe wechselt zu violett.
5. 20 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

Je 25 µl der so vorbereiteten Proben werden in dem ELISA eingesetzt.

7.2 Durchführung Elisa

1. **25 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS** pipettieren.
Nicht benötigte Mikrotiterstreifen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen.
2. **50 µl ADMA Antiserum** **AS** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Haftklebefolie **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** (s. 6.2) füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papiertuch) 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 alle Vertiefungen pipettieren.
6. 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. **100 µl Substrat** **SUB** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. **100 µl Stopplösung** **STOP** in alle Vertiefungen pipettieren und mindestens 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

8. Auswertung

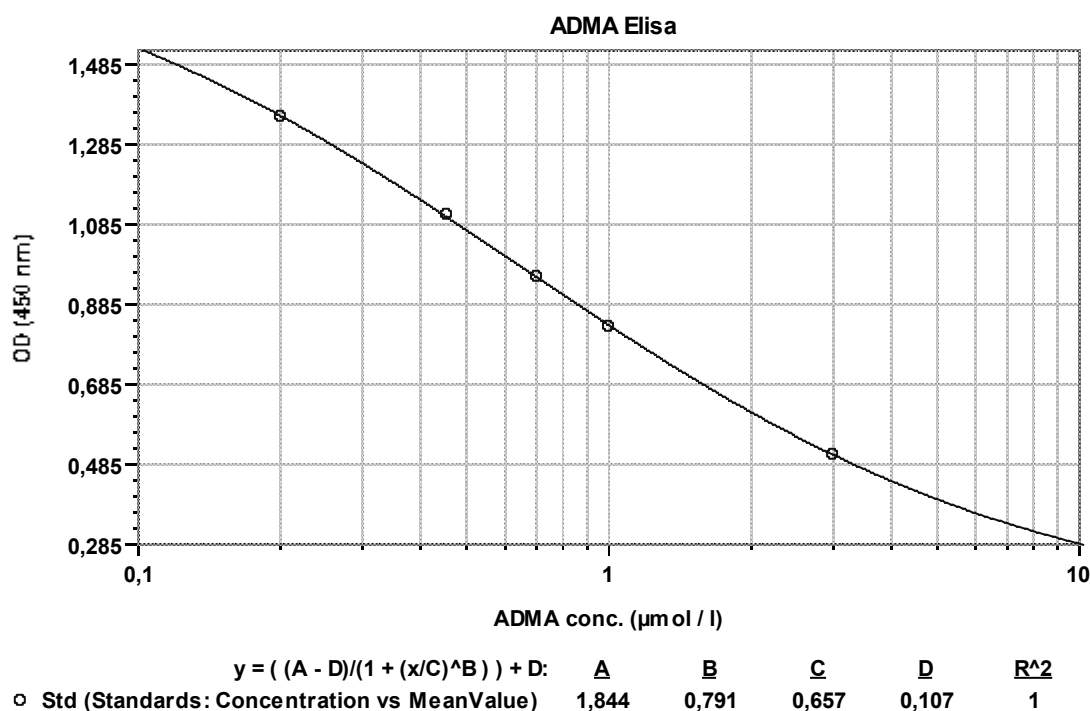
Standard		1	2	3	4	5	6
ADMA	µmol / l	0	0,2	0,45	0,7	1	3
ADMA	ng / ml	0	40	91	141	202	606

Umrechnung: ADMA: 1 µmol / l = 202 ng / ml

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 analytische Sensitivität

Untere Nachweisgrenze	Berechnung
0,03 µmol / l	$OD_{Cal1} - 3 \times SD$

9.2 analytische Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
ADMA	100
SDMA	0,05
Monomethylarginin (NMMA)	1,93
Homoarginin	< 0,01
Arginin	0,03

9.3 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (µmol / l)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	0,43 – 1,55	99	90 - 107
Serum	0,54 – 1,72	92	87 - 102

9.4 Linearität

Matrix	Bereich (µmol / l)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
EDTA-Plasma	0,23 – 1,53	1 : 6 mit Wasser	99	92 - 105

9.5 Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (µmol / l)	Intra-Assay-Vk
EDTA-Plasma	0,58 – 1,04	4,9 – 5,4 %

Matrix	Bereich (µmol / l)	Inter-Assay-Vk
EDTA-Plasma	0,57 – 1,34	4,3 – 9,6 %

9.6 Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Serum + EDTA-Plasma	LC/MS	$Y = 0,99 \times LC/MS + 0,02$; $R = 0,983$; $N = 32$

9.7 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz.

9.8 Grenze der Methode

Die Ergebnisse sind nur für Forschungszwecke geeignet.

Proben oberhalb des höchsten Standards müssen mit Wasser (s. Linearität) verdünnt und erneut bestimmt werden. Die Werte von verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

9.9 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

10. Literatur

Literatur unter Einsatz des ADMA-ELISA der DLD Diagnostika Von Wesamin für DLD produziert

Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Böger RH.

Determination of ADMA using a novel ELISA assay.

Clin. Chem. Lab. Med. 2004; 42: 1377-1383

Krempf TK, Kähler J, Maas R, Silberhorn L, Meinertz T, Böger RH.

Elevation of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in patients with unstable angina and recurrent Plasmaiovascular events.

Eur. Heart J. 2005; 26: 1846-1851

Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn L, Böger RH.

Determination of a reference value for N,N-dimethyl-L-arginine in 500 subjects.

Eur. J. Clin. Invest. 2005; 35 : 622-626

Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T.

Asymmetric dimethylarginine and the risk of Plasmaiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study.

Circ. Res. 2005; 97: e53-59

O'Dwyer MJ, Dempsey F, Crowley V, Kelleher D, McManus R, Ryan T.

Septic shock correlates with ADMA levels which may be influenced by a polymorphism in DDAH II: a prospective observational study.

Crit. Care 2006; 10: (5): R139

Antoniades C, Tousoulis D, Marinou K, Vasiliadou C, Tentolouris C, Bouras G, Pitsavos C, Stefanidis C.

Asymmetrical dimethylarginine regulates endothelial function in methionine-induced but not in chronic homocystinemia in humans: effect of oxidative stress and proinflammatory cytokines

Am. J. Clin. Nutr. 2006; 84: 781-788

Wang TZ., Chen WJ., Cheng WC., Lin JW., Chen MF., Lee YT.

Relation of improvement in endothelium-dependent flowmediated vasodilation after Rosiglitazone to changes in asymmetric dimethylarginine, endothelin-1, and C-reactive protein in nondiabetic patients with the metabolic syndrome

Am. J. Plasmaiol. 2006; 9: 1057-1062

Wanby P., Nilsson I., Brudin L., Nyhammar I., Gustafsson I., Carlsson M.

Increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with carotid stenosis: no evidence for the role of the common FABBP2 A54T gene polymorphism

Acta Neurol. Scand. 2007; 115: 90-96

Konishi H, Sydow K, Cooke JP.

Dimethylarginine dimethylaminohydrolase promotes endothelial repair after vascular injury

J. Am. Coll. Plasmaiol. 2007; 49: 1099-1105

Iribarren C, Husson G, Sydow K, Wang BY, Sidney S, Cooke JP.

Asymmetric dimethyl-arginine and coronary artery calcification in young adults entering middle age: the PLASMAIA Study

Eur. J. Plasmaiovasc. Prev. Rehabil. 2007; 14:222-229

Melikian N, Wheatcroft SB, Ogah OS, Murphy C, Chowienczyk PJ, Wierzbicki AS, Sanders TA, Jiang B, Duncan ER, Shah AM, Kearney MT.

Asymmetric dimethylarginine and reduced nitric oxide bioavailability in young Black African men
Hypertension 2007; 49: 873-877

Horowitz JD, Heresztyn T.

An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: Methodological considerations.

J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2007; epub ahead of print

Korish AA, Arafah MM.

Catechin combined with vitamins C and E ameliorates insulin resistance (IR) and atherosclerotic changes in aged rats with chronic renal failure (CRF)

Arch. Gerontol. Geriatr. 2007; in press

Charitidou C, Farmakiotis D, Zournatzi V, Pidonia I, Pegiou T, Karamanis N, Hatzistilianou M, Katsikis I, Panidis D.

The administration of estrogens, combined with anti-androgens, has beneficial effects on the hormonal features and asymmetric dimethyl-arginine levels, in women with the polycystic ovary syndrome

Atherosclerosis 2007; in press

Allgemeine Literatur

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S.

Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure

Lancet 1992; 339: 572 - 575

Stühlinger M, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS.

Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor

J. Am. Med. Assoc. 2002; 287: 1420-1426

Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich JC, Böger RH.

Asymmetric dimethylarginine (ADMA): An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase predicts mortality in end-stage renal disease (ESRD)

Lancet 2001; 358: 2113-2117

Nijveldt RJ, Teerlink T, Van der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, van Leeuwen PA.

Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality

Clin. Nutr. 2003; 22: 23-30

Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH.

Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia

Lancet 2003; 361: 1511-1517

Böger RH.

The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel Plasmaiovascular risk factor

Plasmaiovasc. Res. 2003; 59: 824-833

Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC.

Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse Plasmaiovascular events after percutaneous coronary intervention.

Eur Heart J. 2003; 24: 1912-1919

Pipettierschema Probenvorbereitung

		Standard	Kontrolle	Plasma	Serum
Standard 1 - 6	µl	20			
Kontrolle 1 & 2	µl		20		
Plasma	µl			20	
Serum	µl				20
Acylierungspuffer	µl	20	20	20	20
Ausgleichsreagenz	µl	200	200	200	200

Platte 10 Sekunden schütteln

Acylierungs-Reagenz	µl	50	50	50	50
----------------------------	----	----	----	----	----

Sofort 20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

25 µl Überstand für ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA

		Standard	Kontrolle	Probe
Acyl. Standard	µl	25		
Acyl. Kontrolle	µl		25	
Acyl. Probe	µl			25
Antiserum	µl	50	50	50

Platte mit Haftklebefolie abkleben.
90 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Enzymkonjugat	µl	100	100	100
----------------------	----	-----	-----	-----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Substrat	µl	100	100	100
-----------------	----	-----	-----	-----

25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung	µl	100	100	100
--------------------	----	-----	-----	-----

Platte 10 mindestens Sekunden schütteln
Messung der Extinktion bei 450 nm