



Gebrauchsanweisung

SDMA human ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
endogenem symmetrischen Dimethyl-Arginin (SDMA)
in humanem Serum oder EDTA-Plasma

CE

IVD

REF SDMH00

Σ 96

$+2/-8^{\circ}\text{C}$ 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

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.

Darüber hinaus 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-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-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-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 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.
- 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.
- 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.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- 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.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

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	Mikrotiterstreifen Je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit SDMA	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	CON 1 & 2		2 Fläschchen
4.4	Acylierungspuffer 3,5 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt	ACYL-BUFF	 Achtung	1 Fläschchen
4.5	Acylierungsreagenz 3 ml, lyophilisiert, mit Solvent auflösen	ACYL-REAG		3 Fläschchen
4.6	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
4.7	Antiserum 7 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acyl-SDMA	AS	 Achtung	1 Fläschchen

4.8	Enzymkonjugat 13 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ	 Achtung	1 Fläschchen
4.9	Waschpuffer 20 ml, Konzentrat (50x)	WASH		1 Fläschchen
4.10	Substrat 13 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	SUB		1 Fläschchen
4.11	Stopplösung 13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3 M Schwefelsäure	STOP		1 Fläschchen
4.12	Reaktionsplatte für die Acylierung	ACYL-PLATE		1 Stück
4.13	Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit 21 ml dest. Wasser lösen	EQUA-REAG		1 Fläschchen
4.14	Haftklebefolie Gebrauchsfertig	FOIL		2 Stück

Zusätzliches Material (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Rollmischer
- 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 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 mischen.
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 alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** mit dem nächsten Punkt fortfahren. Farbe wechselt zu violett.
5. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

Je 20 µl der acylierten Proben werden im ELISA eingesetzt.

7.2 Durchführung ELISA

1. **20 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 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 ein Waschgerät verwendet werden.
5. **100 µl Enzymkonjugat** **CONJ** in alle Vertiefungen 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 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

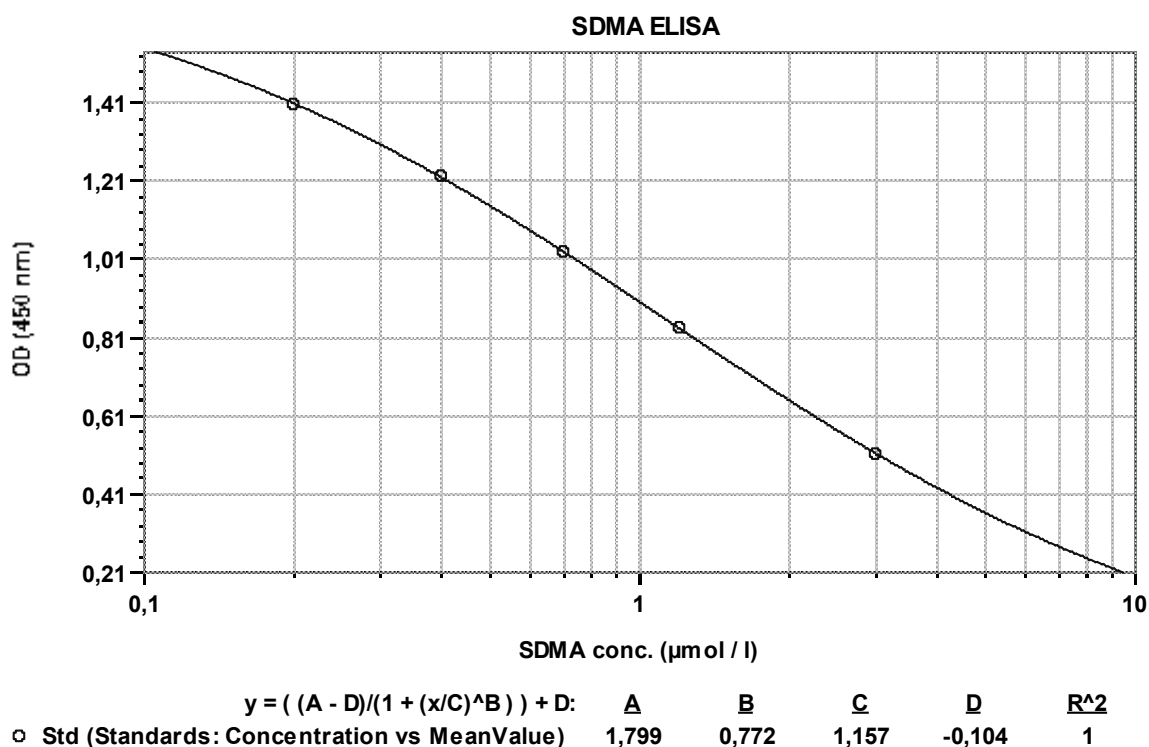
Standard		1	2	3	4	5	6
SDMA	µmol / l	0	0,2	0,4	0,7	1,2	3
SDMA	ng / ml	0	40	81	141	242	606

Umrechnung: SDMA: 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 Referenzbereiche

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

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

9.2 Sensitivität

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

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 + EDTA-Plasma	LC/MS	$Y = 0,96 \times LC/MS + 0,05$; $R = 0,987$; $N = 32$

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. Verwendete Symbole



In-Vitro-Diagnostikum



CE markiert



Inhalt



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Temperaturbegrenzung



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Bestellnummer



Gebrauchsanweisung beachten

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

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

Acylierungsreagenz	µl	50	50	50	50
---------------------------	----	----	----	----	----

Sofort 20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

20 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA

		Standard	Kontrolle	Probe
Acyl. Standard	µl	20		
Acyl. Kontrolle	µl		20	
Acyl. Probe	µl			20
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 mindestens 10 Sekunden schütteln

Messung der Extinktion bei 450 nm