



Gebrauchsanweisung

SDMA vet ELISA

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

Nur für veterinärmedizinische Diagnostik

REF	SDM00
-----	-------

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

Verwendete Symbole



Inhalt



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Temperaturbegrenzung



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Bestellnummer



Gebrauchsanweisung beachten

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

1. Einleitung und Testprinzip

SDMA (symmetrisches Dimethylarginin) identifiziert eine Nierenerkrankung bereits bei einem Verlust der Nierenfunktion von etwa 30-40%. Eine Erhöhung der Kreatininkonzentration tritt erst dann ein, wenn etwa 75% der Nephrone nicht mehr funktionsfähig sind. Somit ist SDMA im Gegensatz zu Kreatinin ein weitaus sensiblerer Biomarker für die Beurteilung der Nierenfunktion bei Hund und Katze. Unser SDMA-ELISA ist schnell und präzise. Der für die Routine geeignete Test liefert SDMA-Werte in weniger als 3 Stunden. Er ist damit für die schnelle Diagnose erhöhter SDMA-Spiegel bei der Beurteilung der Nierenfunktion im Serum und Plasma geriatrischer Hunde und Katzen geeignet. SDMA ist immer im Zusammenhang mit Kreatinin und den Ergebnissen der Urinuntersuchung, insbesondere des spezifischen Harngewichts, zu beurteilen.

Erkrankungen der Niere sind bei älteren Hunden und Katzen sehr häufig anzutreffen und haben schwerwiegende gesundheitliche Folgen. Im Laufe des Lebens entwickelt eine von drei Katzen und einer von zehn Hunden eine Nierenerkrankung.

SDMA ist eine methylierte Form der Aminosäure Arginin, die nach Proteolyse eines intranukleären Proteins von allen kernhaltigen Zellen in die Zirkulation freigesetzt wird. Es wird zu mehr als 90% glomerulär filtriert und renal eliminiert. SDMA ist damit spezifisch für die Nierenfunktion.

Dabei ist SDMA unabhängig von der Muskelmasse und eignet sich deshalb auch gut für das Monitoring alter und minder bemuskelter Tiere mit chronischer Nierenerkrankung.

Der SDMA-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem SDMA in Plasma und Serum von Hund oder Katze.

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 für Veterinärmedizinische 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.
- 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.

Die 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	1 Fläschchen
4.5	Acylierungsreagenz 3 ml, lyophilisiert, mit Solvent auflösen	ACYL-REAG	3 Fläschchen
4.6	Solvent 10 ml, gebrauchsfertig, enthält DMSO	SOLVENT	1 Fläschchen
4.7	Antiserum 7 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acyl-SDMA	AS	1 Fläschchen
4.8	Enzymkonjugat 13 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ	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



Achtung



Gefahr



Achtung



Achtung



Achtung

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

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 Reagenzien

Mikrotiterstreifen **STRIP**

Mikrotiterstreifen 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.

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.

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.

Acylierungs-Reagenz **ACYL-REAG**

Inhalt des Fläschchens mit 3 ml Solvent **SOLVENT** lösen und mindestens 10 Minuten auf den Rollmischer 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 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. Plastikschrälen. 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.

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.
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.o.) 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, 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
µmol / l	0	0,2	0,4	0,7	1,2	3
ng / ml	0	40	81	141	242	606

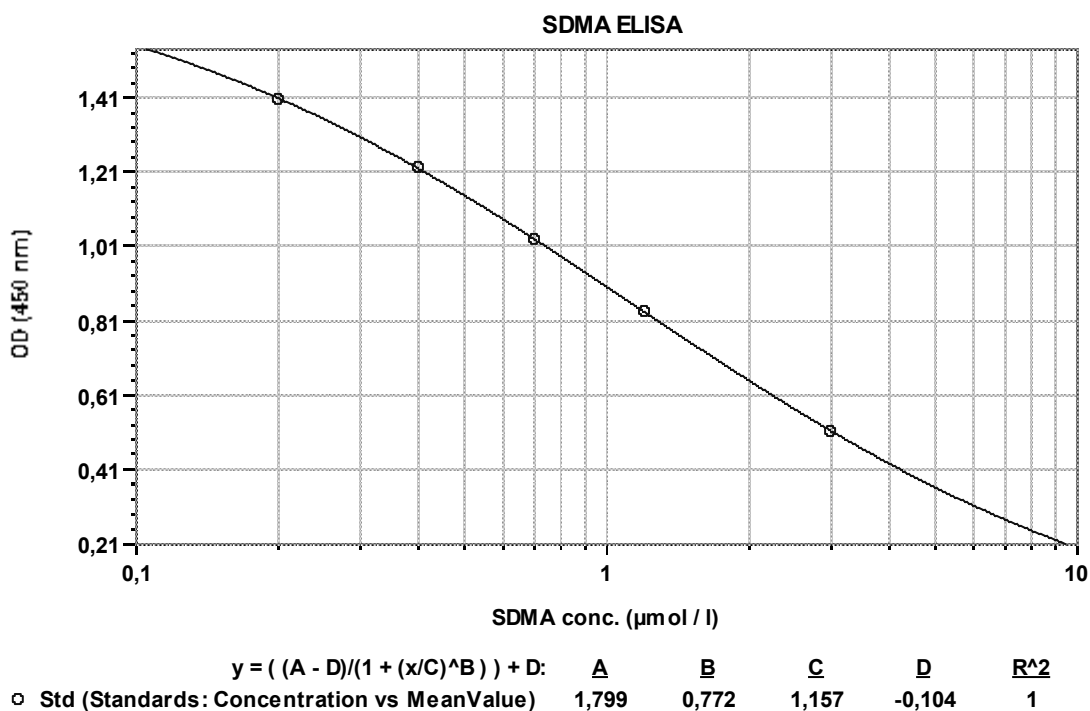
Umrechnung: SDMA: 1 µmol/l = 202 ng/ml = 20,2 µg/dl

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

Erwartete Werte (Serum, EDTA-Plasma)

Hund: 0,30 – 0,65 µmol/l (6,0 – 13 µg/dl)

Katze: 0,30 – 0,75 µmol/l (6,0 – 15 µg/dl)

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

9.2 Sensitivität

0,03 µmol/l (0,6 µg/dl)

9.3 Wiederfindung

9.3.1 Wiederfindung Katze

Unterschiedliche Mengen an SDMA wurden zu einem Serumpool von Katzen gegeben und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von SDMA wurde bei 10 verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Serumprobe betrug 101 %.

zugesetzt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0,00	0,58		
0,12	0,68	0,70	97
0,24	0,77	0,82	91
0,35	0,86	0,93	92
0,45	0,91	1,03	88
0,55	0,99	1,13	88
0,65	1,24	1,23	101
0,77	1,71	1,35	127
1,04	1,90	1,62	117
1,35	1,95	1,93	101
1,65	2,29	2,23	103

Mittelwert 101

Konzentrationsangaben in µmol/l

9.3.2 Wiederfindung Hund

Unterschiedliche Mengen an SDMA wurden zu einem Serumpool von Hunden gegeben und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von SDMA wurde bei 10 verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Serumprobe betrug 104 %.

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0,00	0,54		
0,12	0,74	0,66	112
0,24	0,74	0,78	95
0,35	0,86	0,89	97
0,45	0,94	0,99	95
0,55	1,01	1,09	93
0,65	1,19	1,18	101
0,77	1,51	1,31	115
1,04	1,73	1,58	109
1,35	2,19	1,89	116
1,65	2,23	2,19	102

Mittelwert 104

Konzentrationsangaben in $\mu\text{mol/l}$

9.4 Linearität

9.4.1 Linearität Katze

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe von der Katze mit Wasser bestimmt. Die mittlere Linearität aller 7 Verdünnungen betrug in der Serumprobe 96%.

Verdünnung	Messwert	extrapolierter Ausgangswert	Wiederfindung %
orig.	2,09		
4 + 1	1,73	2,16	103
2 + 1	1,30	1,95	93
1 + 1	0,95	1,90	91
1 + 2	0,59	1,77	85
1 + 3	0,52	2,08	100
1 + 5	0,33	1,98	95
1 + 7	0,28	2,24	107

Mittlere Wiederfindung 96

Konzentrationsangaben in $\mu\text{mol/l}$

9.4.2 Linearität Hund

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe vom Hund mit Wasser bestimmt. Die mittlere Linearität aller 7 Verdünnungen betrug in der Serumprobe 92%.

Verdünnung	Messwert	extrapolierter Ausgangswert	Wiederfindung %
orig.	1,88		
4 + 1	1,30	1,63	87
2 + 1	1,21	1,82	97
1 + 1	0,92	1,84	98
1 + 2	0,59	1,77	94
1 + 3	0,43	1,72	91
1 + 5	0,28	1,68	89
1 + 7	0,20	1,60	85

mittlere Wiederfindung 92

Konzentrationsangaben in $\mu\text{mol/l}$

9.5 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Der in dem Test verwendete Antikörper ist spezifisch für SDMA. Getestet wurden die Kreuzreaktivitäten zu Arginin, Homoarginin, Monomethylarginin (NMMA) und ADMA.

Substanz	ED-50-Wert ($\mu\text{mol/l}$)	Kreuzreaktivität (%)
SDMA	1,39	100
ADMA	84	1,2
NMMA	182	0,76
Homoarginin	2807	0,05
Arginin	8574	0,016

9.6 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Methode wurde durch die Ermittlung der Intra-Assay- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten gezeigt (Konzentrationsangaben in $\mu\text{mol/l}$):

Intra-Assay Katze

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
K1	40	0,837	0,064	7,6
K2	40	0,862	0,049	5,7
K3	40	0,770	0,058	7,7

Intra-Assay Hund

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
H1	40	0,531	0,061	11,5
H2	40	0,804	0,068	8,5
H3	40	0,776	0,046	5,9

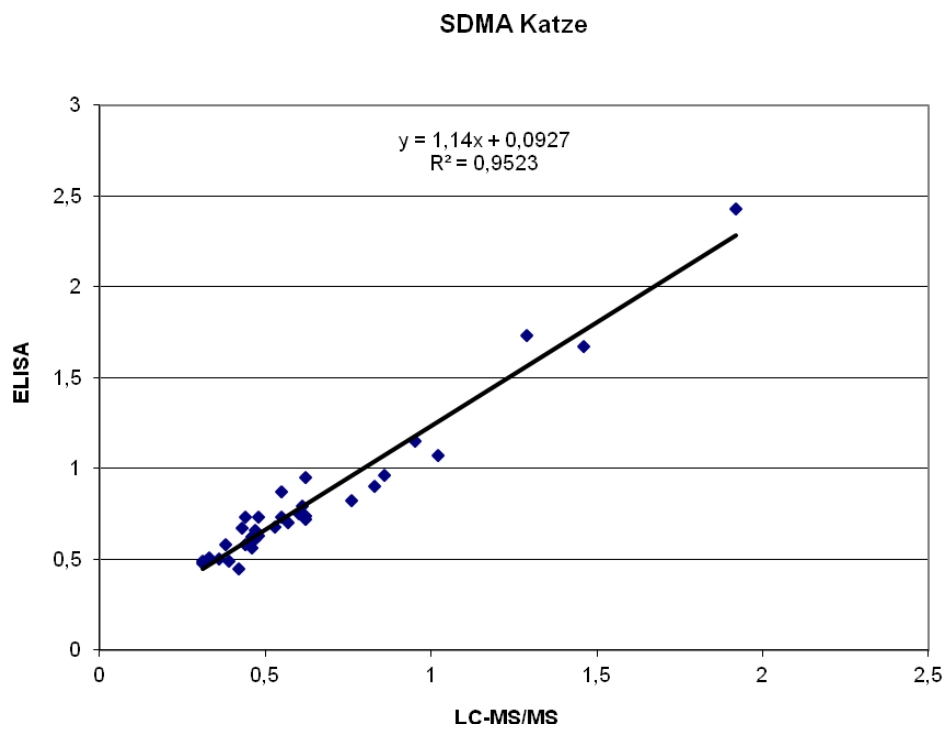
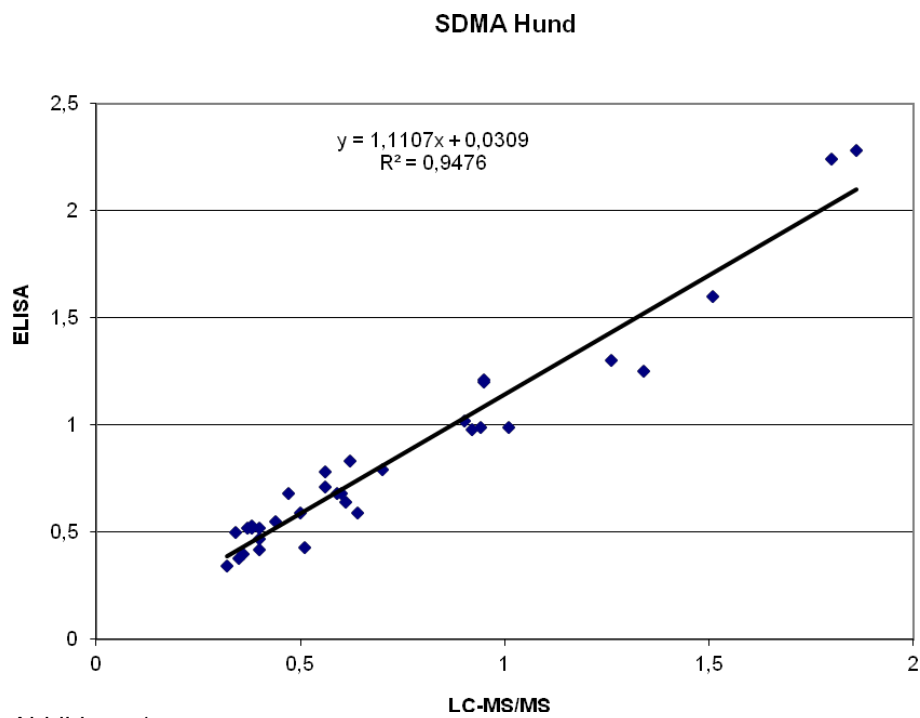
Inter-Assay Katze

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
H1	32	0,49	0,037	7,5
H2	32	0,59	0,043	7,3
H3	32	0,72	0,079	11,0
H4	32	0,74	0,058	7,8
H5	32	0,84	0,068	8,1
H6	32	0,84	0,982	9,7

Inter-Assay Hund

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
H1	32	0,49	0,042	8,5
H2	32	0,66	0,046	7,0
H3	32	0,76	0,063	8,2
H4	32	0,93	0,069	7,4
H5	32	1,21	0,128	10,6
H6	32	1,35	0,152	11,3

9.7 Methodenvergleich



Die Abbildungen 1 & 2 zeigen die Korrelation ELISA zur LC-MS/MS Methode

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. 9.4 Linearität) verdünnt und erneut bestimmt werden.

9.10 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

10. Literatur

Josipa Kuleš, Petra Bilić, Blanka Beer Ljubić, Jelena Gotić, Martina Crnogaj, Mirna Brkljačić, Vladimir Mrljak

Glomerular and tubular kidney damage markers in canine babesiosis caused by *Babesia canis*

Ticks and Tick-borne Diseases (2018) **9** 1508 - 1517

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

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