




## Arbeitsanleitung


# SDMA - ELISA

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



**REF** EA203/96

 12 x 8

 2 – 8 °C

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH  
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Tel 040-555 87 10 • Fax 040-555 87 111  
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • E-Mail: [contact@dld-diagnostika.de](mailto:contact@dld-diagnostika.de)

August 2011

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Testprinzip	Seite	3
2.	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	4
3.	Lagerung und Haltbarkeit	Seite	4
4.	Inhalt des Testbestecks	Seite	5
5.	Probengewinnung	Seite	6
6.	Vorbereitung der Reagenzien und Proben	Seite	7
7.	Testdurchführung ELISA	Seite	9
8.	Auswertung	Seite	10
9.	Testcharakteristika	Seite	11
10.	Literatur	Seite	14
	Pipettierschema Probenvorbereitung	Seite	15
	Pipettierschema ELISA	Seite	16

## 1. Einleitung und Testprinzip

Die exakte Bestimmung der Nierenfunktion ist aufgrund der Notwendigkeit einer Dosisanpassung zahlreicher Arzneistoffe bei eingeschränkter Nierenfunktion ein wichtiger Bestandteil der klinischen Beurteilung eines Patienten. Auch geringe Einschränkungen der Nierenfunktion gehen mit einer Steigerung des Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen einher. Da der meistverwendete Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion, die Serum-Kreatinin-Konzentration, bei geringen Einschränkungen der Nierenfunktion noch nicht ansteigt, besteht eine Notwendigkeit, sensitivere Marker der Nierenfunktion insbesondere bei geringgradiger Funktionseinschränkung anzubieten. SDMA ist ein methyliertes Derivat der Aminosäure L-Arginin (symmetrisches Dimethylarginin). SDMA wird ausschließlich durch renale Exkretion aus dem Körper eliminiert; daher ist die SDMA-Plasmakonzentration eng mit der Nierenfunktion korreliert. Somit bietet die Messung von SDMA eine Möglichkeit zur sensitiven Bestimmung renaler Funktionseinschränkungen, wie in mehreren klinischen Studien belegt werden konnte: In 18 klinischen Studien mit über 2.100 Patienten fand sich eine hochsignifikante Korrelation der SDMA-Plasmakonzentration mit der Inulin-Clearance bzw. mit verschiedenen Methoden der Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate. Darüberhinaus gibt es Hinweise, dass erhöhte SDMA-Konzentrationen, wie sie z.B. bei eingeschränkter Nierenfunktion vorliegen können, auch unabhängig vom Grad der Nierenfunktionseinschränkung ein kardiovaskuläres Erkrankungsrisiko anzeigen.

Die bisher verfügbaren Messverfahren zur quantitativen Bestimmung von SDMA in Plasma, Serum, Urin und anderen biologischen Flüssigkeiten basierten allesamt auf dem chemischen Nachweisverfahren der Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (HPLC). Diese Methode ist jedoch sehr zeit- und personalintensiv, teuer, und somit für die klinische Routinediagnostik nicht geeignet. Der SDMA-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 (symmetrisches Dimethyl-Arginin) in Serum oder EDTA-Plasma. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird SDMA durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-SDMA umgewandelt.

Der von der DLD Diagnostika GmbH neu entwickelte 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. Vorsichtsmaßnahmen**

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.
- Die angegebenen Verfallsdaten sind unbedingt zu beachten.
- Die Reagenzien bis zur Verwendung bei 2 - 8 °C lagern.
- Während der Testdurchführung Einmal-Handschuhe tragen.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett.

## **3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien**

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien siehe Vorbereitung der Reagenzien.

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

## 4. Inhalt des Testbesteckes

- 4.1 **MT-Streifen** **STRIPS** 12 Stück  
Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen,  
einzeln abbrechbar, beschichtet mit SDMA

- 4.2 **Standards 1 - 6** **CAL 1 - 6** 6 Fläschchen  
Je 4 ml, gebrauchsfertig  
Konzentrationen:

Standard	1	2	3	4	5	6
µmol/l	0	0,08	0,25	0,5	0,8	3,0

- 4.3 **Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2** 2 Fläschchen  
Je 4 ml, gebrauchsfertig  
Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat im Kit

- 4.4 **Acylierungspuffer** **ACYL-BUFF** 1 Fläschchen  
3,5 ml, gebrauchsfertig

- 4.5 **Acylierungsreagenz** **ACYL-REAG** 2 Fläschchen  
lyophilisiert, Inhalt eines Fläschchens  
mit 2,8 ml Solvent lösen  
und gegebenenfalls vereinigen (s. auch 6.4)

- 4.6 **Antiserum** **AS** 1 Fläschchen  
5,5 ml, gebrauchsfertig  
Kaninchen-anti-N-Acyl-SDMA

- 4.7 **Enzymkonjugat** **CONJ** 1 Fläschchen  
12 ml, gebrauchsfertig  
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase

- 4.8 **Waschpuffer** **WASH** 1 Fläschchen  
20 ml, Konzentrat  
Inhalt mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen.

- 4.9 **Substrat** **SUB** 1 Fläschchen  
12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig

4.10	<b>Stopplösung</b> 12 ml, gebrauchsfertig Enthält 0,3 M Schwefelsäure	<b>STOP</b>	1 Fläschchen
4.11	<b>Reaktionsplatte</b> für die Acylierung	<b>ACYL-PLATE</b>	1 Stück
4.12	<b>Ausgleichsreagenz</b> lyophilisiert, mit 20,5 ml dest. Wasser lösen vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden	<b>EQUA-REAG</b>	1 Fläschchen
4.13	<b>Solvent</b> 6 ml Aceton/DMSO (bitte beachten: SOLVENT greift Plastik an; SOLVENT reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen)	<b>SOLVENT</b>	1 Fläschchen

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 25, 50, 100 und 250 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 nm)
- Horizontal-Schüttler
- Vortex-Mischer
- Rollenmischer

## 5. Probengewinnung

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

Hämolytische und insbesondere lipämische Proben sollten im Assay nicht eingesetzt werden.

Die Proben können bis zu 24 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 12 Monate gelagert werden.

Wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen sollte vermieden werden.

## 6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

### 6.1 MT-Streifen **STRIPS**

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.

### 6.2 Waschpuffer **WASH**

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen. Der fertige Waschpuffer muß bei 2 - 8 °C gelagert werden.

### 6.3 Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG**

Inhalt des Fläschchens in 20,5 ml destilliertem Wasser lösen, kurz mischen (Vortex) und 30 min auf den Rollenmischer legen.

Das gelöste Ausgleichsreagenz kann für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren und mindestens für 1 Jahr gelagert werden.

### 6.4 Acylierungsreagenz **ACYL-REAG**

Inhalt des Fläschchens in je 2,8 ml SOLVENT lösen und für 5 min auf einen Horizontal-Schüttler legen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden. Durch die 2. Flasche im Kit ist der ELISA in zwei Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt beider Fläschchen poolen.

Bitte beachten, daß SOLVENT mit vielen Plastikmaterialien reagiert, z.B. Plastikschälchen für Mehrkanalpipetten. SOLVENT reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und mit Glasgefäßen.

#### Achtung

Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine hohe Oberfläche haben. Bitte Multipipetten o. ä. verwenden, das aufgelöste Acylierungsreagenz aus dem Fläschchen in die Spritze (über eine aufgesetzte Pipettenspitze) ziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

## 6.5. Probenvorbereitung (Acylierung)

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

1. Je 20 µl Standard 1 - 6, je 20 µl Kontrolle 1 & 2 und je 20 µl Probe in die jeweiligen Vertiefungen der im Kit enthaltenen Reaktionsplatte pipettieren.
2. Je 25 µl Acylierungspuffer in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Je 200 µl Ausgleichsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren.
4. Reaktionsplatte ca. 10 Sekunden mischen.
5. Acylierungsreagenz frisch ansetzen und je 50 µl Acylierungsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** mischen.

### Achtung

Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine hohe Oberfläche haben. Bitte Multipetten o. ä. verwenden, das aufgelöste Acylierungsreagenz aus dem Fläschchen in die Spritze (über eine aufgesetzte Pipettenspitze) ziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren.

6. Reaktionsplatte 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren, Platte nicht abkleben oder abdecken, offen schütteln.

**Je 20 µl der so vorbereiteten Proben werden in den SDMA-ELISA eingesetzt.**

## 7. Testdurchführung ELISA

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

### 7.1 Proben-Inkubation

Jeweils 20 µl vorbereitete Standards 1 bis 6, 20 µl der vorbereiteten Kontrollen und 20 µl der vorbereiteten Proben (vorzugsweise als Doppelbestimmungen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.

Je 50 µl Antiserum in alle Vertiefungen pipettieren und kurz auf dem Horizontal-Schüttler mischen. Platte mit Haftklebefolie abdecken und 12 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren.

### 7.2 Waschen

Vertiefungen entleeren, mit ca. 250 µl Waschpuffer füllen für einige Sekunden auf dem Horizontal-Schüttler mischen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.

### 7.3 Konjugat-Inkubation

Jeweils 100 µl Enzymkonjugat in die Vertiefungen pipettieren.

60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren.

### 7.4 Waschen

Wie unter Punkt 7.2 beschrieben.

### 7.5 Substrat-Inkubation

Jeweils 100 µl Substrat in die Vertiefungen pipettieren und 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (unter Schütteln).

### 7.6 Stoppen der Substrat-Inkubation

Jeweils 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen pipettieren; dabei die gleiche Reihenfolge und den gleichen Zeittakt einhalten wie bei Zugabe der Substratlösung.

### 7.7 Messung

Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Meßwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) gegen Luft messen.

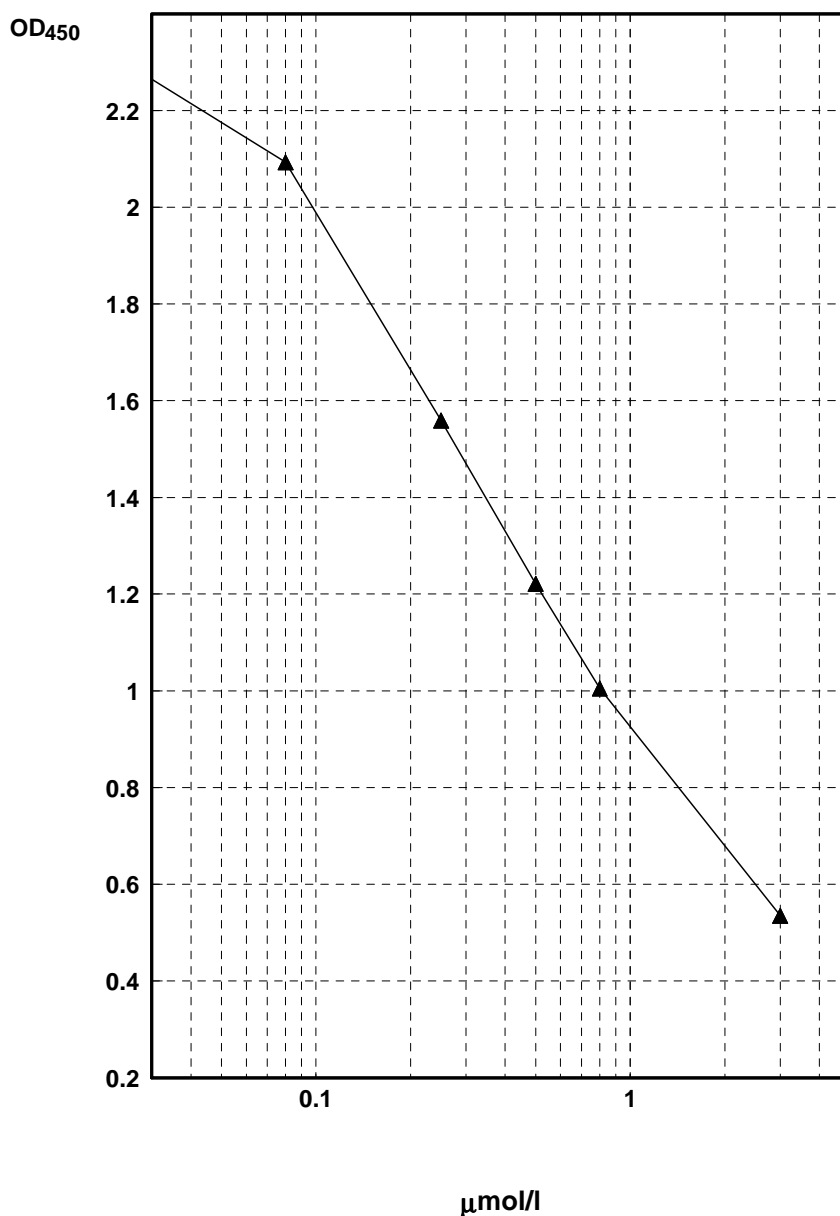
## 8. Auswertung

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen. Alternativ kann auch die Cubic-Spline-Methode oder die Logit-Log-Berechnung verwendet werden.

Die Konzentrationen der Kontrollen und Patientenproben können dann direkt aus der Eichkurve in  $\mu\text{mol/l}$  abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



## 9. Testcharakteristika

### Referenzbereiche

0,30 – 0,70 µmol/l (60 – 140 ng/ml)

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

### Sensitivität

0,05 µmol/l

### Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an SDMA wurden zu einer Serumprobe gegeben und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von SDMA wurde bei 14 verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Serumprobe betrug 104 % (97 – 109%).

zugesezt	gemessen	erwartet	% Wiederfindung
0,00	0,36		
0,10	0,48	0,46	104
0,20	0,58	0,56	104
0,30	0,72	0,66	109
0,40	0,82	0,76	108
0,50	0,93	0,86	108
0,60	0,95	0,96	99
0,80	1,23	1,16	106
1,00	1,43	1,36	105
1,25	1,56	1,61	97
1,50	1,96	1,81	108
1,75	2,29	2,11	109
2,00	2,43	2,36	103
2,25	2,74	2,61	105
2,50	2,77	2,86	97

**Mittelwert 104**

Konzentrationsangaben in µmol/l

## Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe bestimmt. Die mittlere Linearität aller 9 Verdünnungen betrug in der Serumprobe 98% (90 - 106%)

<b>Verdünnung</b>	<b>Messwert</b>	<b>extrapolierter Ausgangswert</b>	<b>Wiederfindung %</b>
orig.	2,360		
4 + 1	1,693	2,12	90
2 + 1	1,661	2,49	106
1 + 1	1,133	2,27	96
1 + 2	0,775	2,33	99
1 + 4	0,455	2,28	97
1 + 6	0,344	2,41	102
1 + 9	0,228	2,28	97
1 + 15	0,143	2,29	97
1 + 24	0,089	2,23	94

**mittlere Wiederfindung**

**98**

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

## Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

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

<b>Substanz</b>	<b>ED-50-Wert (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b>Kreuzreaktivität (%)</b>
SDMA	0,36	100
Arginin	4500	< 0,01
NMMA	43	0,70
ADMA	81	0,44

## Reproduzierbarkeit

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

### Intra-Assay

<b>Probe</b>	<b>Anzahl n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>	<b>VK (%)</b>
1	40	0,524	0,030	5,7
2	40	0,752	0,046	6,1
3	40	1,723	0,081	4,7

## 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

## Pipettierschema Probenvorbereitung

		Standards	Kontrolle	Probe
Standard 1 - 6	µl	20		
Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Patientenprobe	µl			20
Acylierungspuffer	µl	25	25	25
Ausgleichsreagenz	µl	200	200	200

10 Sekunden schütteln

frisch angesetztes Acylierungsreagenz	µl	50	50	50
--	----	----	----	----

Anschließend sofort für 90 Minuten auf einem Horizontal-Schüttler bei Raumtemperatur schütteln, dabei die Platte **nicht** abkleben oder abdecken, offen schütteln.

## Pipettierschema ELISA

	Standard	Kontrolle	Proben
Standard 1 - 6 $\mu\text{l}$	20		
Kontrolle 1 & 2 $\mu\text{l}$		20	
Patientenprobe $\mu\text{l}$			20
Antiserum $\mu\text{l}$	50	50	50

Kurz auf dem Horizontal-Schüttler mischen und für  
12– 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C mit Folie abgedeckt inkubieren

4 x Waschen mit je 250  $\mu\text{l}$  Waschpuffer

Enzymkonjugat $\mu\text{l}$	100	100	100
-----------------------------	-----	-----	-----

60 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen mit je 250  $\mu\text{l}$  Waschpuffer

Substrat $\mu\text{l}$	100	100	100
------------------------	-----	-----	-----

20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung $\mu\text{l}$	100	100	100
---------------------------	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm