DIAGNOSTIKA GMBH

Gebrauchsanweisung

ADMA Fast ELISA

Enzymimmunoassay für die
Quantitative Bestimmung von
Endogenem Asymmetrischen Dimethyl-Arginin (ADMA)
in humanem Serum und Plasma

R U O

Nur für Forschungszwecke

REF EA212/96

Σ 12 x 8

+2 +8 °C 2 – 8 °C

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Tel. +49 40 5558710 • Fax +49 40 55587111
Internet: http://www.dld-diagnostika.de • E-Mail: contact@dld-diagnostika.de contact@dld-diagnostika.de

Inhaltsverzeichnis

1 Testprinzip 5
2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen 5
3 Lagerung und Haltbarkeit 6
4 Inhalt des Kits 6
5 Probengewinnung und -lagerung 8
6 Vorbereitung der Reagenzien 9
7 Testdurchführung ELISA 10
8 Auswertung 12
9 Testcharakteristika 13
10 Literatur 14
11 Änderungen 14
Pipettierschema - Probenvorbereitung 16
Pipettierschema - ELISA 16

Verwendete Symbole

RUO	Nur für Forschungszwecke		
CONT	Inhalt		Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung	+2 +8 °C	Temperaturbegrenzung
	Hersteller	Σ	Inhalt austreichend für <n> Prüfungen
REF	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole

	Gefahr		Achtung

1 Testprinzip

Der ADMA Fast ELISA Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem ADMA (asymmetrisches Dimethyl-Arginin) in Serum oder EDTA-Plasma. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird ADMA durch das Acylierungsreagenz 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 Waschschritt 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 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 Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten 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 Kits* und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutz-regularien 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 Kits

MT-Streifen **STRIPS** 12 Stück

Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen,
einzeln abbrechbar, beschichtet mit ADMA

Standards 1 – 6 **CAL 1 - 6** 6 Flaschen

Je 4 ml, gebrauchsfertig

Standard	1	2	3	4	5	6
ADMA µmol/l	0	0,2	0,45	0,7	1	3

Kontrolle 1 & 2 **CON 1 & 2** 2 Flaschen

Je 4 ml, gebrauchsfertig,
Bereich: siehe QC Zertifikat

Acylierungspuffer 3,5 ml, gebrauchsfertig, blau eingefärbt	**ACYL-BUFF**	1 Flasche Achtung
Acylierungsreagenz lyoph., Inhalt einer Flasche mit 3 ml Solvent lösen (s. 6.)	**ACYL-REAG**	3 Flaschen
Antiserum ADMA 7 ml, gebrauchsfertig, blau eingefärbt, Kaninchen-anti-N-Acyl-ADMA	**AS**	1 Flasche
Enzymkonjugat 13 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	**CONJ**	1 Flasche
Waschpuffer 20 ml, Konzentrat, Inhalt mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen	**WASH**	1 Flasche
Substrat 13 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	**SUB**	1 Flasche
Stopplösung 13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0.3M Schwefelsäure	**STOP**	1 Flasche
Reaktionsplatte Für die Acylierung	**ACYL-PLATE**	1 Stück
Ausgleichsreagenz Lyoph., mit 21 ml dest. Wasser lösen, vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden (s. 6.)	**EQUA-REAG**	1 Flasche

Solvent **SOLVENT** 2 Flaschen

5 ml, enthält DMSO
(bitte beachten: Solvent greift Plastik an;
Solvent reagiert nicht mit normalen
Pipettenspitzen und Glasgefäßen)

Gefahr

Achtung

Haftklebefolie **FOIL** 2 Stück

gebrauchsfertig

Weiter werden benötigt (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.

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

6.1 Ausgleichsreagenz

Inhalt des Fläschchens EQUA-REAG 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 Fläschchens WASH mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, 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

Benötigte Fläschchen Acylierungs-Reagenz ACYL-REAG 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 ACYL-REAG mit 3 ml Solvent SOLVENT lösen und mindestens 10 Minuten auf den Rollenmischer 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 ELISA

Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es empfiehlt sich, Doppelbestimmungen anzusetzen.

7.1 Probenvorbereitung (Acylierung)

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

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 jede Vertiefung pipettieren.
3. **200 µl gelöstes Ausgleichsreagenz** ACYL-REAG in jede Vertiefung pipettieren.
   Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
4. Bitte beachten: Acylierungsreagenz ACYL-REAG 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 jede Vertiefung pipettieren und **<u>sofort</u>** mit Punkt 5. fortfahren. Farbe wechselt zu violett.
5. 20 Minuten bei Raumtemperatur 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.
2. **50 µl Antiserum ADMA** AS in jede Vertiefung pipettieren.
3. Platte mit Folie 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** WASH füllen 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.
   Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
5. **100 µl Enzymkonjugat** CONJ in jede Vertiefung 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 jede Vertiefung pipettieren.
9. 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. **100 µl Stopplösung** STOP in jede Vertiefung pipettieren. Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
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

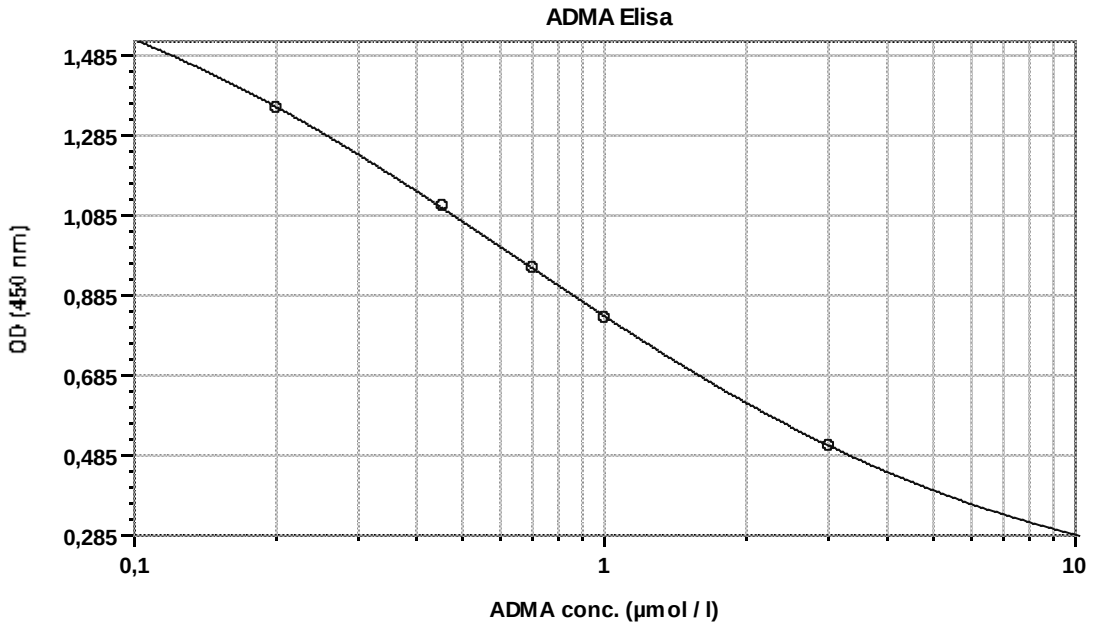
Umrechnung: 1 µmol ADMA/l = 202 ng ADMA/ml

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 einer Standardkurve (nicht für die Berechnung verwenden):



	y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D:	A	B	C	D	R^2
○	Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	1,844	0,791	0,657	0,107	1

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	ODCal1 – 3 x 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 + Plasma	LC/MS	Y = 0,99 x LC/MS + 0,02; R = 0,983; N = 32

9.7 Grenze der Methode

Die Ergebnisse sind nur für Forschungszwecke geeignet.

10 Literatur

- 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

- 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

Ein ausführliches Verzeichnis der Publikationen, in denen der DLD ADMA ELISA eingesetzt wurde, kann auf Nachfrage erhalten werden (contact@dld-diagnostika.de).

11 Änderungen

Version _8: Der Assay ist ab Charge AFE117 nur noch als RUO erhältlich (kein IVD). Anpassung der Gebrauchsanleitung durch Ersetzen von IVD durch RUO und Entfernung der Einleitung und des Referenzbereichs sowie weitere Änderungen/Ergänzungen, die grau unterlegt sind.

Version _7: Die Arbeitsanleitung wurde neu formatiert. Die Hersteller- und Distributorangaben wurden geändert. Die Abschnitte 6 und 7 und das Pipettierschema wurde um die Komponentenbezeichnung laut Etikett ergänzt, um die Zuordnung zu erleichtern. Es wurden keine Änderungen an den Komponenten oder an der Durchführung vorgenommen.

Pipettierschema - Probenvorbereitung

		Standards	Kontrollen	Plasma	Serum
ACYL-PLATE:					
CAL 1 - 6	µl	20			
CON 1 & 2	µl		20		
Plasma	µl			20	
Serum	µl				20
ACYL-BUFF	µl	20	20	20	20
EQUA-REAG	µl	200	200	200	200

Platte 10 Sekunden schütteln

ACYL-REAG (frisch)	µl	50	50	50	50

<u>Sofort</u> 20 Minuten bei RT schütteln

Pipettierschema - ELISA

		Acyl. Standards	Acyl. Kontrollen	Acyl. Proben
STRIPS:				
Übertragung von ACYL-PLATE in STRIPS:	µl	25	25	25
AS	µl	50	50	50

Platte mit FOIL abkleben.
90 Minuten bei RT schütteln
4 x Waschen mit ca. 300 µl WASH pro Vertiefung

CONJ	µl	100	100	100

30 Minuten bei RT schütteln
4 x Waschen mit ca. 300 µl WASH pro Vertiefung

SUB	µl	100	100	100

25 ± 5 Minuten bei RT schütteln

STOP	µl	100	100	100

Platte 10 Sekunden schütteln
Messung der Extinktion bei 450 nm (Ref. 570 nm – 650 nm)