




Arbeitsanleitung


ADMA Fast ELISA

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



REF EA212/96

 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

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Testprinzip	Seite	5
2.	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	6
3.	Lagerung und Haltbarkeit	Seite	7
4.	Inhalt des Testbestecks	Seite	7
5.	Probengewinnung	Seite	9
6.	Vorbereitung der Reagenzien	Seite	9
7.	Testdurchführung ELISA	Seite	10
8.	Auswertung und Beurteilung	Seite	12
9.	Testcharakteristika	Seite	13
10.	Literatur	Seite	14
	Pipettierschema Probenvorbereitung	Seite	15
	Pipettierschema ELISA	Seite	16

Verwendete Symbole

 IVD	In-Vitro-Diagnostikum		CE markiert
 CONT	Inhalt		Verwendbar bis
 LOT	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
 REF	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole

	Gefahr
	Achtung
	Gefahr

1. Einleitung und Testprinzip

Die endogenen Methyl-Arginine ADMA und SDMA sind Derivate der Aminosäure L-Arginin. L-Arginin ist die Vorstufe zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) im menschlichen Körper. NO wiederum ist ein wichtiger physiologischer Mediator im Herz-Kreislaufsystem und in anderen Organsystemen, der an der Regulation von Blutdruck und Gefäßwiderstand, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, Adhäsion von Leukozyten und Monozyten und der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt ist. NO spielt auch eine wichtige physiologische Rolle bei der Erektion. Bei Herz-Kreislaufkrankungen wie Arteriosklerose, Hypercholesterinämie, Hypertonie, chronischer Herzinsuffizienz, bei Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, bei Präeklampsie, bei erektiler Dysfunktion und anderen Erkrankungen kommt es zur Abschwächung der biologischen Wirkungen von NO, wodurch das Fortschreiten dieser Erkrankungen und der begleitenden Gefäßläsionen beschleunigt wird. Durch die Gabe von L-Arginin kann diesem Geschehen entgegengewirkt werden.

In mehreren klinischen und experimentellen Untersuchungen (s. Literaturübersicht) konnte gezeigt werden, dass es bei den genannten Erkrankungen zu einem Ansteigen der Konzentration des endogenen L-Arginin-Analogons ADMA im Plasma oder Serum kommen kann. Erhöhte ADMA-Konzentrationen sind somit ein für das zukünftige Fortschreiten o.a. Erkrankungen prognostisch relevanter Faktor.

Die verfügbaren Messverfahren zur quantitativen Bestimmung von ADMA und 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 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 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.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, 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.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in *4. Inhalt des Testbestecks* 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.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit ist 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 Testbestecks

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

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

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

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
Blau eingefärbt



Achtung

4.5 **Acylierungsreagenz** **ACYL-REAG** 3 Fläschchen
lyophilisiert, Inhalt eines Fläschchens
mit 3 ml Solvent lösen und
gegebenenfalls vereinigen

4.6 **Antiserum ADMA** **AS** 1 Fläschchen
7 ml, gebrauchsfertig
Blau eingefärbt
Kaninchen-anti-N-Acyl-ADMA

4.7	Enzymkonjugat 13 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ		Achtung	1 Fläschchen
4.8	Waschpuffer 20 ml, Konzentrat Inhalt mit dest. Wasser auf 1.000 ml auffüllen.	WASH			1 Fläschchen
4.9	Substrat 13 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	SUB		Gefahr	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	EQUA-REAG			1 Fläschchen
4.13	Solvent 5 ml, enthält DMSO (bitte beachten: Solvent greift Plastik an; Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen)	SOLVENT		Gefahr	2 Fläschchen
4.14	Haftklebefolie Gebrauchsfertig	FOIL			2 Stück

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

5. Probengewinnung

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

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 **WASH**

Inhalt des Fläschchens 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. Für eine Lagerung bis zum Verfallsdatum muss der verdünnte Waschpuffer bei -20 °C eingefroren werden.

Acylierungs-Reagenz **ACYL-REAG**

Inhalt des Fläschchens mit 3 ml 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

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

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

7.1 Probenvorbereitung (Acylierung)

1. **20 µl Standard 1 - 6, Kontrolle 1 & 2, Plasma und Serum** in die entsprechenden Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettieren.
2. **20 µl Acylierungspuffer** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. **200 µl gelöstes Ausgleichsreagenz** in alle Vertiefungen pipettieren.
Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
4. Bitte beachten: Acylierungsreagenz reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastischälchen. 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 in alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** 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 pipettieren.
2. **50 µl ADMA Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Platte mit Folie 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** 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** 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** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

8. Auswertung und Beurteilung

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

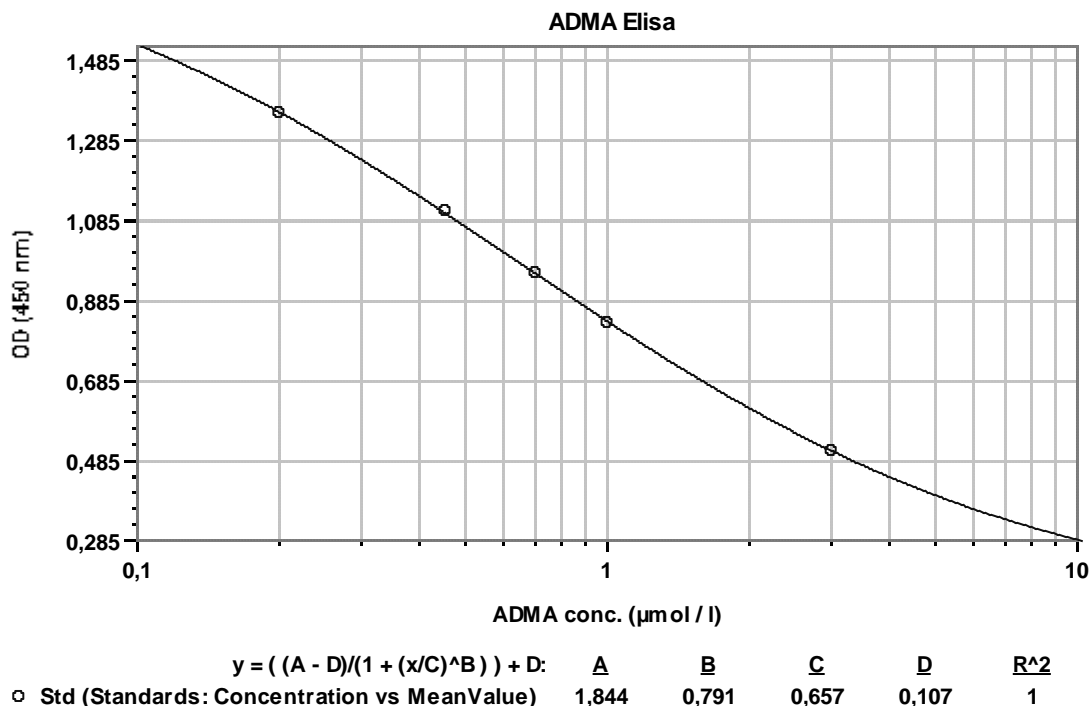
Umrechnung: 1 µmol ADMA / l = 202 ng ADMA / ml

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:



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	0,40 – 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 (%)
ADMA	100
SDMA	0,05
Monomethylarginin (NMMA)	1,93
Homoarginin	< 0,01
Arginin	0,03

9.4 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

9.5 Linearität

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

9.6 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 %

9.7 Methodenvergleich

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

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, steht auf der Webseite <http://www.dld-diagnostika.de> bei der Produktinformation über den ADMA ELISA:

http://www.dld-diagnostika.de/uploads/uploads/ADMA_published_studies_DLD-Diagnostika_update_June-2014.pdf

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

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 Folie 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
---------------------------	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm