

Arbeitsanleitung / Manual

SDMA ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von SDMA in humanem Serum, EDTA- und Li-Heparin-Plasma sowie in Serum, EDTA- und Li-Heparin-Plasma von Hunden und Katzen

For the in vitro determination of SDMA in human, canine and feline serum, EDTA and Li-heparin plasma

Gültig ab / Valid from 2018-05-30

REF

K 7780



+2°C

+8°C

-20°C

STD
CTRL 1
CTRL 2

IVD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.Immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema Probenvorbereitung</i>	5
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Spike-Wiederfindung</i>	9
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Spezifität</i>	12
<i>Korrelation mit HPLC-MS</i>	12
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
13. TECHNISCHE MERKMALE	13
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13
15. LITERATUR	14
<i>Allgemeine Literatur</i>	14
<i>Literatur mit Immundiagnostik SDMA ELISA</i>	14

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von von SDMA in humanem Serum, EDTA- und Li-Heparin-Plasma sowie in Serum, EDTA- und Li-Heparin-Plasma von Hunden und Katzen geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

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 die Notwendigkeit, sensitivere Marker der Nierenfunktion insbesondere bei geringgradiger Funktionseinschränkung anzubieten.

SDMA ist ein methyliertes Derivat der Aminosäure L-Arginin. SDMA wird ausschließlich durch renale Exkretion aus dem Körper eliminiert; daher korreliert die SDMA-Plasmakonzentration eng mit der Nierenfunktion. 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 2136 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, mit der erhöhten Wahrscheinlichkeit eines sequenziellen Organversagens für Niere und Leber sowie einem erhöhten kardiovaskulären Risiko korrelieren.

Indikationen

- Niereninsuffizienz
- Kardiovaskuläres Risiko bei Renaler Dysfunktion
- Hypertonie bei Renaler Dysfunktion

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7780	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7780	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 0,1; 0,3; 0,6; 1,5; 4,0 µM)	6 x 500 µl
K 7780	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig, (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 µl
K 7780	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig, (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 µl
K 7780	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7780	AB	SDMA-Antikörper, gebrauchsfertig	1 x 6 ml
K 7780	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 12 ml
K 7780	DERBUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7780	DER	Derivatisierungsreagenz, gebrauchsfertig	1 x 6 ml
K 7780	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7780	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehaltes im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2-8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die gebrauchsfertigen **Standards und Kontrollen (STD/CTRL)** werden bei **-20°C** gelagert. Sie sind so bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Nach Gebrauch wieder einfrieren.
- Das **Derivatisierungsreagenz (DER)** ist gebrauchsfertig in DMSO gelöst und kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. DMSO kristallisiert bei 2-8 °C aus. Das DER muss vor dem Öffnen auf Raumtemperatur gebracht werden, bis die Kristalle vollständig gelöst sind. Bitte beachten: DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Serum, EDTA- und Li-Heparin-Plasma

- Frisch abgenommenes Serum, EDTA- und Li-Heparin-Plasma kann bei Raumtemperatur bis zu 48 Stunden oder bei 2-8 °C drei Tage gelagert werden. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden.

- Die Proben werden **unverdünnt** verwendet.
Falls weniger als 50 µl Probe vorhanden ist, empfehlen wir eine 1:2 Verdünnung in Reaktionspuffer (25 µl Probe + 25 µl DERBUF). Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.
- Zur weiteren Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen SDMA versetzt (siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von SDMA. Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen SDMA versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe zusammen mit einem polyklonalen SDMA-Antiserum in einer mit SDMA-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein peroxidasemarkierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die SDMA-Antikörper bindet. Nach einem Waschschritt zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidase-substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender SDMA-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema Probenvorbereitung

Vor Gebrauch alle **Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15-30 °C) bringen, gut mischen.

Die Derivatisierung der Standards, der Kontrollen und der Proben wird in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen) durchgeführt.

Wir empfehlen, pro Standard, Kontrolle und Probe je eine Derivatisierung durchzuführen und diese jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Mikrotiterplatte aufzutragen.

1.	200 µl Standard (STD) bzw. 200 µl Kontrolle (CTRL) bzw. 50 µl Probe in die jeweiligen Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
2.	150 µl Reaktionspuffer (DERBUF) nur zu den Proben in den Reaktionsgefäßen pipettieren.
3.	50 µl Derivatisierungsreagenz in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und gründlich mischen , z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen. Anschließend auf einem Horizontalschüttler 45 min bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren.

2 x 50 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben in Doppelbestimmung in einem Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.

4.	2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
5.	50 µl SDMA-Antikörper (AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter Schütteln inkubieren.

10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
12.	10-15 min* bei Raumtemperatur (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren.
13.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden..

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

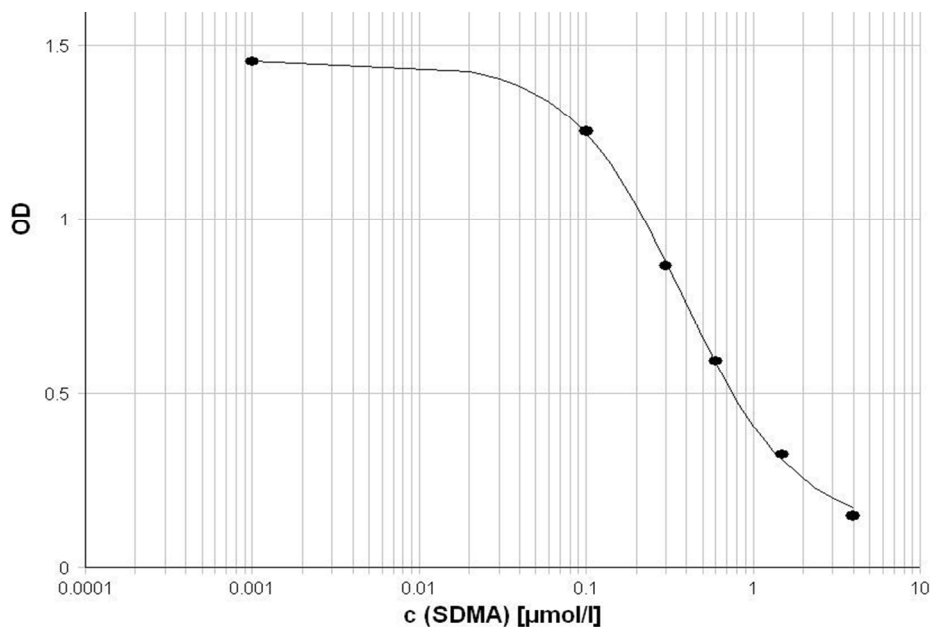
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Serum, EDTA- und Li-Heparin-Plasma

Die Konzentrationen der Proben können direkt aus der Standardkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Es wird **kein Faktor** benötigt.

Bei 1:2 vorverdünnten Proben muss dieser Faktor berücksichtigt werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.



9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD niedriger ist als die des höchsten Standards, sollten mit Reaktionspuffer (DERBUF) verdünnt werden und nochmals im Assay gemessen werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit humanen Serumproben von augenscheinlich gesunden Personen (n = 40) wurde ein Mittelwert von 0,47 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung (SD) von 0,07 µmol/l. Aus Mittelwert $\pm$ 2 SD ergibt sich ein Normbereich von 0,33 - 0,61 µmol/l.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 10)

Probe	SDMA [µmol/l]	VK [%]
1	0,27	7,5
2	0,67	4,8

Inter-Assay (n = 6)

Probe	SDMA [µmol/l]	VK [%]
1	0,22	9,9
2	0,63	7,4

Spike-Wiederfindung

Mensch

Eine Serumprobe wurde mit unterschiedlichen SDMA-Mengen versetzt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 100,4 % (n = 5).

Spike [µmol/l]	SDMA erwartet [µmol/l]	SDMA gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
0		0,736	
0,5	1,236	1,220	98,7
1	1,736	1,774	102,2

Hund

Zwei Serumproben wurden mit unterschiedlichen SDMA-Mengen versetzt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 94,1 % (n = 2).

Spike [µmol/l]	SDMA erwartet [µmol/l]	SDMA gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
0		0,526	
0,5	1,026	0,937	91,3
1	1,526	1,561	102,3
0		0,454	
0,5	0,954	0,897	94,0
1	1,454	1,288	88,6

Katze

Zwei Serumproben wurden mit unterschiedlichen SDMA-Mengen versetzt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 95,4 % (n = 2).

Spike [µmol/l]	SDMA erwartet [µmol/l]	SDMA gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
0		0,395	
0,5	0,895	0,833	93,1
1	1,395	1,252	89,8
0		0,326	
0,5	0,826	0,818	99,0
1	1,326	1,321	99,6

Wiederfindung in der Verdünnung

Mensch

Eine mit SDMA gespikete Serumprobe wurde mit Reaktionspuffer verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 90,4 % (n = 5).

Verdünnung	SDMA erwartet [µmol/l]	SDMA gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
		1,774	
1:2	0,887	0,876	98,8
1:4	0,444	0,364	82,1

Hund

Zwei Serumproben wurden mit einem Serum mit einer SDMA-Konzentration von 0,126 µmol/l verdünnt. Die mittlere Wiederfindung betrug 109,0 % (n = 2).

Verdünnung	SDMA erwartet [µmol/l]	SDMA gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
		0,526	
1:2	0,326	0,334	102,5
1:4	0,226	0,241	106,6
		0,454	
1:2	0,290	0,340	117,2
1:4	0,208	0,228	109,6

Katze

Zwei Serumproben wurden mit einem Serum mit einer SDMA-Konzentration von 0,126 µmol/l verdünnt. Die mittlere Wiederfindung betrug 97,1 % (n = 2).

Verdünnung	SDMA erwartet [µmol/l]	SDMA gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
		0,395	
1:2	0,261	0,247	94,8
1:4	0,193	0,194	100,4
		0,326	
1:2	0,226	0,231	102,2
1:4	0,176	0,160	90,9

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 - 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 40-mal der STD 1 (Null-Standard). Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,05 µmol/l.

Probe	Mittelwert [OD]	2 x Standard- abweichung (2 SD)	Nachweis- grenze [µmol/l]
STD 1	2,3	0,14	0,05

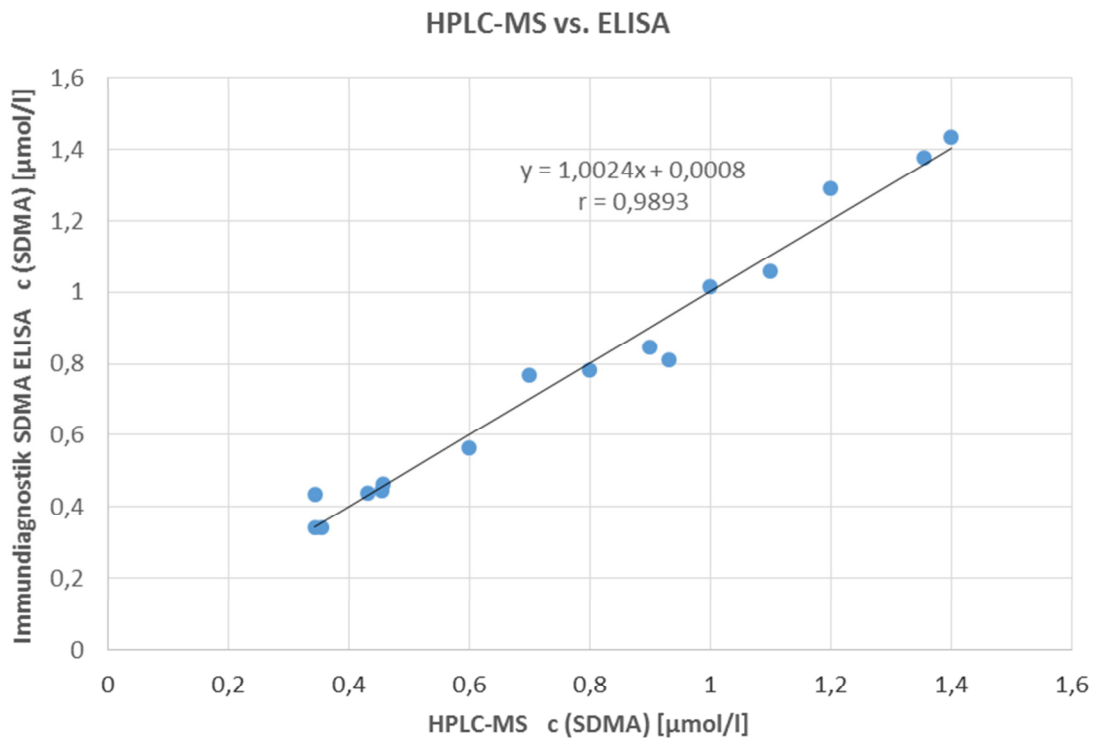
Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die SDMA-Reaktivität.

ADMA	< 0,1 %
L-Arginin	< 0,001 %

Korrelation mit HPLC-MS

Die Korrelation mit HPLC-MS wurde anhand von 16 Proben ermittelt, sie betrug $r = 0,99$.



12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch

Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettivolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immun-

diagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

Allgemeine Literatur

1. Fleck C, Schweitzer F, Karge E, Busch M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clinical Chimica Acta* **336**: 1 – 12 (2003).
2. D'Apolito O, Paglia G, Tricarico F, Garofalo D, Pilotti A, Lamacchia O, Cignarelli M, Corso G. Development and validation of a fast quantitative method for plasma dimethylarginines analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* **41**: 1391 – 1395 (2008).
3. Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Böger SM, Cooke JP, Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function – a meta-analysis. *Nephrol. Dial. Transplant* **21**: 2446 - 2451 (2006).
4. Bode-Böger SM, Scalera F, Kielstein JT, 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.* **17**: 1128 – 1134 (2006).

Literatur mit Immundiagnostik SDMA ELISA

5. Koch A, Weiskirchen R, Bruensing J, Dückers H, Buendgens L, Kunze J, Matthes M, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Regulation and prognostic relevance of symmetric dimethylarginine serum concentrations in critical illness and sepsis. *Mediators of Inflammation* **2013**: 413826 (2013).
6. Tenderenda-Banasiuk E, Wasilewska A, Taranta-Janusz K, Korzeniecka-Kozerska A. Asymmetric and symmetric dimethylarginine in adolescents with hyperuricemia. *Disease Markers* **35**: 407-412 (2013).

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer

*In-Vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Achtung



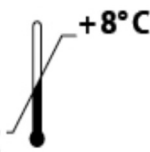
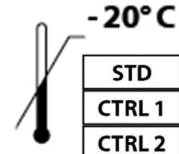
Gebrauchsanweisung beachten

Manual

SDMA ELISA

For the in vitro determination of SDMA in human, canine and feline serum, EDTA and Li-heparin plasma

Valid from 2018-05-30

**K 7780****+2°C****+8°C**

STD
CTRL 1
CTRL 2



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.Immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	18
2. INTRODUCTION	18
3. MATERIAL SUPPLIED	19
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	20
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	20
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Sample preparation procedure</i>	21
<i>Test procedure</i>	22
8. RESULTS	23
9. LIMITATIONS	24
10. QUALITY CONTROL	24
<i>Reference range</i>	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
<i>Precision and reproducibility</i>	25
<i>Spiking recovery</i>	25
<i>Dilution recovery</i>	26
<i>Analytical sensitivity</i>	27
<i>Specificity</i>	27
<i>Correlation with HPLC-MS</i>	28
12. PRECAUTIONS	28
13. TECHNICAL HINTS	29
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	29
15. REFERENCES	29
<i>General literature</i>	29
<i>Literature using Immundiagnostik SDMA ELISA</i>	30

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of SDMA in human, canine and feline serum, EDTA and Li-heparin plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

The dosage of most drugs must be adapted in renal insufficiency, making accurate assessment of renal function a prerequisite in clinical medicine. Furthermore, even a modest decline in renal function has been recognized as a cardiovascular risk.

In clinical practice serum creatinine is typically used to assess renal function, but this serum creatinine does not increase at modest decline in renal function. Consequently, there is an ongoing search for suitable endogenous markers of renal function.

SDMA is a methylated derivative of L-arginine which is strictly eliminated by renal extraction, thus the SDMA plasma level is strongly correlated to renal function. In 18 studies with more than 2136 patients systemic SDMA concentrations correlated highly with inulin clearance, as well as with various clearance estimates combined and serum creatinine. With respect to this, SDMA exhibits properties of a reliable marker of renal dysfunction.

Moreover, there are hints that increased SDMA correlates with total sequential organ failure, indicating both renal and hepatic failure, and with an increased cardiovascular risk.

Indication

- Renal failure
- Cardiovascular risk in renal dysfunction
- Hypertension in renal dysfunction

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 7780	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 7780	STD	Standards, ready-to-use (0, 0.1, 0.3, 0.6, 1.5, 4.0 µM)	6 x 500 µl
K 7780	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 500 µl
K 7780	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 500 µl
K 7780	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7780	AB	SDMA antibody, ready-to-use	1 x 6 ml
K 7780	CONJ	Conjugate, ready-to-use	1 x 12 ml
K 7780	DERBUF	Reaction buffer, ready-to-use	1 x 15 ml
K 7780	DER	Derivatisation reagent, ready-to-use	1 x 6 ml
K 7780	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 7780	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Centrifuge, 3000 g
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2-8 °C for 1 month**.
- Store **standards and controls (STD/CTRL)** frozen at **-20 °C**. They are stable at -20 °C until the expiry date stated on the label. Thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls after use.
- The ready-to-use **derivatisation reagent (DER)** is already dissolved in DMSO and is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. DMSO crystallises at 2-8 °C. Before opening the DER, bring to room temperature and ensure that all crystals are dissolved. Please note: DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2-8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Serum, EDTA and Li-heparin plasma

- Freshly collected serum, EDTA and Li-heparin plasma samples can be stored for up to 48 hours at room temperature or for 3 days at 2-8 °C. For longer storage keep samples frozen at -20 °C.
- The samples are analysed **undiluted**.
If the sample volume is less than 50 µl, we recommend a 1:2 dilution in reaction buffer (25 µl sample + 25 µl DERBUF). This dilution factor must be considered in data evaluation.
- For sample preparation, a derivatisation reagent for derivatisation of SDMA is added (see sample preparation procedure).

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of SDMA. The assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays.

The sample preparation includes the addition of a derivatisation reagent for SDMA derivatisation. Afterwards, the treated samples and the polyclonal SDMA antiserum are incubated in wells of a microtiter plate coated with SDMA derivative (tracer). During the incubation period, the target SDMA in the sample competes with the tracer, immobilised on the wall of the microtiter wells, for the binding of the polyclonal antibodies.

During the second incubation step, a peroxidase conjugated antibody is added to detect the anti-SDMA antibodies. After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The colour changes from blue to yellow and the absorbance is measured in a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour is inverse proportional to the SDMA concentration in the sample; this means high SDMA concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibodies and lowers the photometric signal. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. SDMA, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Sample preparation procedure

Bring **all reagents and samples to room temperature** (15-30 °C) and mix well.

Derivatisation of standards, controls and samples is carried out in single analysis in vials (e.g. 1.5 ml vials).

We recommend preparing one derivatisation per standard, control and sample and transferring it in duplicate determinations into the wells of the microtiter plate.

1.	Add 200 µl standard (STD), 200 µl control (CTRL) and 50 µl sample in the corresponding vials.
2.	Add 150 µl reaction buffer (DERBUF) only to the samples .

3.	Add 50 µl derivatisation reagent into each vial (STD, CTRL, sample), mix thoroughly by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for 45 min at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .
----	---

2 x 50 µl of the derivatised standards, controls and samples are used in the ELISA as duplicates.

Test procedure

Mark the positions of standards/controls/samples in duplicate on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips covered at 2-8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

4.	For the analysis in duplicate, take 2 x 50 µl of the derivatised standards/ controls/samples out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.
5.	Add 50 µl SDMA antibody (AB) into each well of the microtiter plate.
6.	Cover the strips and incubate for 2 hours at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl conjugate (CONJ) into each well.
9.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15-30 °C) on a horizontal shaker .
10.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
11.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
12.	Incubate for 10-15 min* at room temperature (15-30 °C) in the dark .
13.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.

14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (690 nm) as a reference.
-----	--

* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the 4 parameter algorithm.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

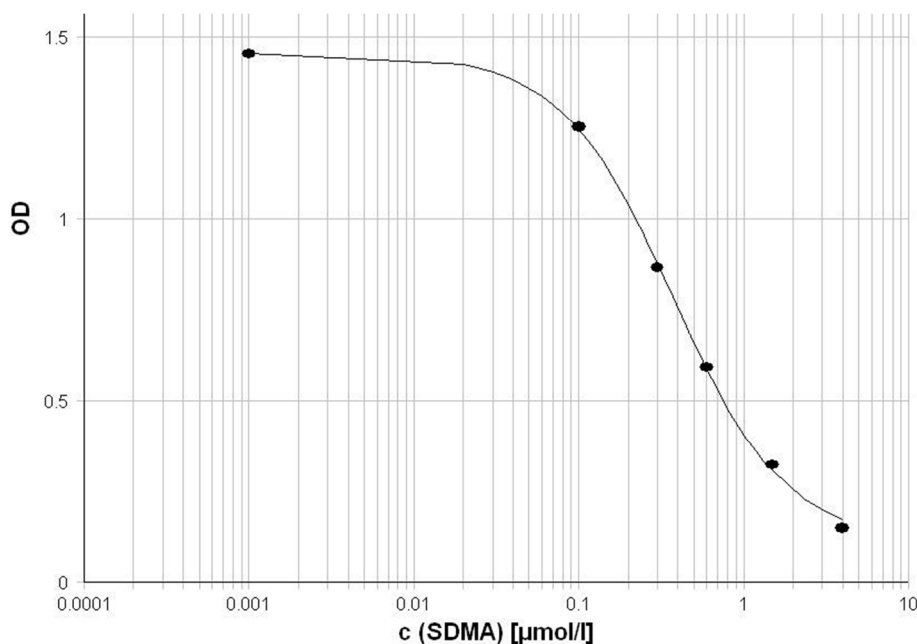
The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Serum, EDTA and Li-heparin plasma

The concentrations can be determined directly from the standard curve in $\mu\text{mol/l}$. **No factor** is required.

Consider the dilution factor if samples have been pre-diluted 1:2.

In the following, an example of a calibration curve is given; do not use it for the calculation of your results.



9. LIMITATIONS

Samples with an OD lower than the OD of the highest standard should be diluted with reaction buffer and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control samples are outside of the acceptable limits.

Reference range

Based on internal studies with human serum samples from apparently healthy persons ($n = 40$), a mean value of $0.47 \mu\text{mol/l}$ was estimated. The standard deviation (SD) was $0.07 \mu\text{mol/l}$. From mean value ± 2 SD a normal range of $0.33 - 0.61 \mu\text{mol/l}$ was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-assay (n = 10)

Sample	SDMA [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	0.27	7.5
2	0.67	4.8

Inter-assay (n = 6)

Sample	SDMA [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	0.22	9.9
2	0.63	7.4

Spiking recovery

Human

One serum sample was spiked with different SDMA concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate was 100.4 % (n = 5).

Spike [$\mu\text{mol/l}$]	SDMA expected [$\mu\text{mol/l}$]	SDMA measured [$\mu\text{mol/l}$]	Recovery [%]
0		0.736	
0.5	1.236	1.220	98.7
1	1.736	1.774	102.2

Dog

Two serum samples were spiked with different SDMA concentrations. The mean recovery rate was 94.1 % (n = 2).

Spike [$\mu\text{mol/l}$]	SDMA expected [$\mu\text{mol/l}$]	SDMA measured [$\mu\text{mol/l}$]	Recovery [%]
0		0.526	
0.5	1.026	0.937	91.3
1	1.526	1.561	102.3
0		0.454	
0.5	0.954	0.897	94.0
1	1.454	1.288	88.6

Cat

Two serum samples were spiked with different SDMA concentrations. The mean recovery rate was 95.4 % (n = 2).

Spike [μmol/l]	SDMA expected [μmol/l]	SDMA measured [μmol/l]	Recovery [%]
0		0.395	
0.5	0.895	0.833	93.1
1	1.395	1.252	89.8
0		0.326	
0.5	0.826	0.818	99.0
1	1.326	1.321	99.6

*Dilution recovery***Human**

One spiked sample was diluted with reaction buffer. The mean recovery rate was 90.4 % (n = 5).

Dilution	SDMA expected [μmol/l]	SDMA measured [μmol/l]	Recovery [%]
		1.774	
1:2	0.887	0.876	98.8
1:4	0.444	0.364	82.1

Dog

Two samples were diluted with serum containing 0.126 μmol/l SDMA. The mean recovery rate was 109.0 % (n = 2).

Dilution	SDMA expected [μmol/l]	SDMA measured [μmol/l]	Recovery [%]
		0.526	
1:2	0.326	0.334	102.5
1:4	0.226	0.241	106.6
		0.454	
1:2	0.290	0.340	117.2
1:4	0.208	0.228	109.6

Cat

Two samples were diluted with serum containing 0.126 µmol/l SDMA. The mean recovery rate was 97.1 % (n = 2).

Dilution	SDMA expected [µmol/l]	SDMA measured [µmol/l]	Recovery [%]
		0.395	
1:2	0.261	0.247	94.8
1:4	0.193	0.194	100.4
		0.326	
1:2	0.226	0.231	102.2
1:4	0.176	0.160	90,9

Analytical sensitivity

The zero-standard (STD 1) was measured 40 times. The detection limit was set as $B_0 - 2 \text{ SD}$ and estimated to be 0.05 µmol/l.

Sample	Mean value [OD]	2 x standard deviation (2 SD)	Detection limit [µmol/l]
zero-standard	2.3	0.14	0.05

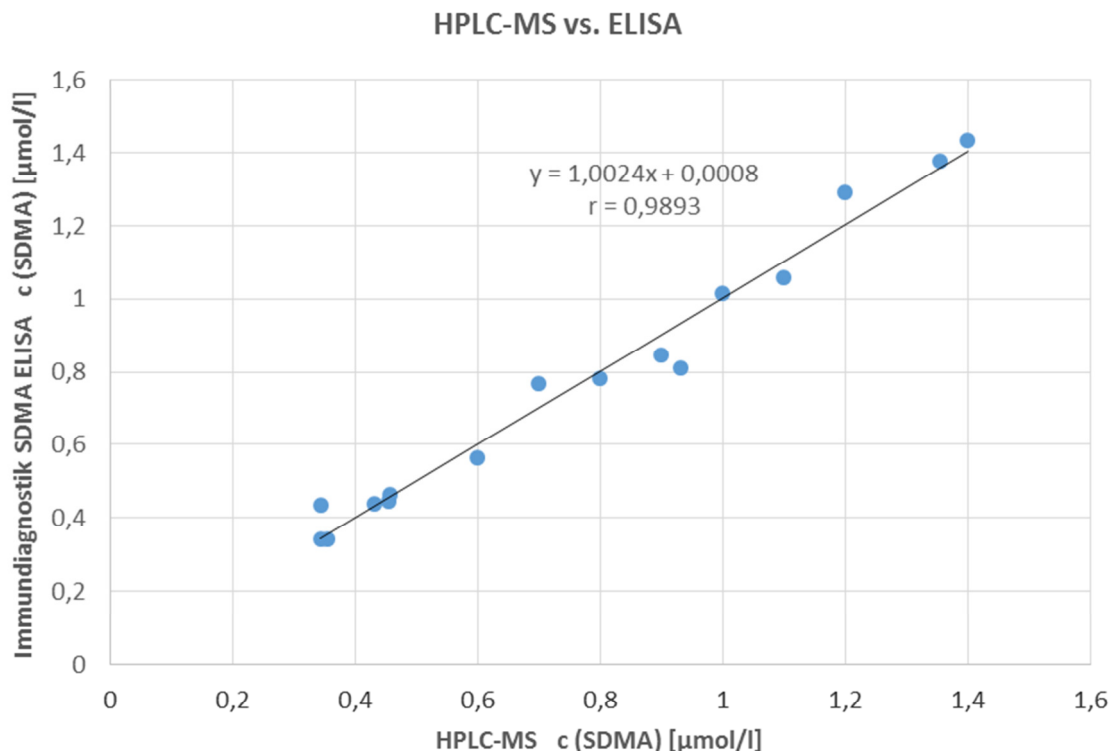
Specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to SDMA. The specificity is calculated in percent in relation to the SDMA-binding activity.

ADMA	< 0.1 %
L-arginine	< 0.001 %

Correlation with HPLC-MS

16 samples were measured with this ELISA and HPLC-MS. The correlation was $r = 0.99$.



12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulfuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

General literature

1. Fleck C, Schweitzer F, Karge E, Busch M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clinical Chimica Acta* **336**: 1 – 12 (2003).

2. D'Apolito O, Paglia G, Tricarico F, Garofalo D, Pilotti A, Lamacchia O, Cignarelli M, Corso G. Development and validation of a fast quantitative method for plasma dimethylarginines analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* **41**: 1391 – 1395 (2008).
3. Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Böger SM, Cooke JP, Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function – a meta-analysis. *Nephrol. Dial. Transplant* **21**: 2446 - 2451 (2006).
4. Bode-Böger SM, Scalera F, Kielstein JT, 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.* **17**: 1128 – 1134 (2006).

Literature using Immundiagnostik SDMA ELISA

5. Koch A, Weiskirchen R, Bruensing J, Dückers H, Buendgens L, Kunze J, Matthes M, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Regulation and prognostic relevance of symmetric dimethylarginine serum concentrations in critical illness and sepsis. *Mediators of Inflammation* **2013**: 413826 (2013).
6. Tenderenda-Banasiuk E, Wasilewska A, Taranta-Janusz K, Korzeniecka-Kozerska A. Asymmetric and symmetric dimethylarginine in adolescents with hyperuricemia. *Disease Markers* **35**: 407-412 (2013).

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use