

Arbeitsanleitung / Manual

# ADMA *direct* (Maus/Ratte) ELISA Kit

*Zur Bestimmung von ADMA in EDTA-Plasma und Serum  
Für Tier- experimentelle Studien  
(nicht für humanes Probenmaterial geeignet)*

# ADMA *direct* (mouse/rat) ELISA Kit

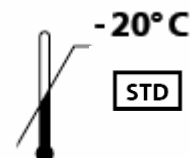
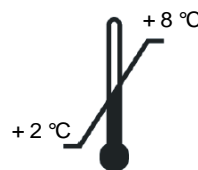
*For the determination of ADMA in EDTA-plasma and serum  
For animal experimental studies  
(not suitable for human samples)*

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 01.08.2008



K 3001



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>4</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>5</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>6</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>6</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>7</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>8</b>
<i>PIPETTIERSHEMA PROBENVORBEREITUNG</i>	<i>9</i>
<i>PIPETTIERSHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i>	<i>9</i>
<b>10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>11</b>
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>13</b>
<i>KREUZREAKTION</i>	<i>13</i>
<i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i>	<i>13</i>
<i>SENSITIVITÄT</i>	<i>13</i>
<i>WIEDERFINDUNG</i>	<i>14</i>
<i>LINEARITÄT</i>	<i>14</i>
<b>12. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>14</b>
<b>13. LITERATUR</b>	<b>15</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>16</b>

---

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>18</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>18</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>21</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>21</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>22</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>23</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>23</b>
<i>SAMPLE PREPARATION PROCEDURE</i>	<i>24</i>
<i>TEST PROCEDURE</i>	<i>24</i>
<b>10. EVALUATION OF RESULTS</b>	<b>26</b>
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>27</b>
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>28</b>
<i>CROSS REACTIVITY</i>	<i>28</i>
<i>PRECISION AND REPRODUCIBILITY</i>	<i>28</i>
<i>SENSITIVITY</i>	<i>28</i>
<i>RECOVERY</i>	<i>29</i>
<i>LINEARITY</i>	<i>29</i>
<b>12. LIMITATIONS</b>	<b>29</b>
<b>13. REFERENCES</b>	<b>30</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>31</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA Test ist für die Bestimmung von asymmetrischem Dimethyl-Arginin (ADMA) in EDTA-Plasma und Serum von Maus und Ratte geeignet. Nur zu Forschungszwecken.

## 2. EINLEITUNG

Asymmetrisches Dimethyl-L-arginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase. Es entsteht bei dem Abbau methylierter Proteine und wird entweder renal eliminiert oder durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) metabolisiert. Verschiedene Zelltypen einschließlich humaner Endothel- und Tubuluszellen bilden und verstoffwechseln ADMA. Bei einer Reihe von Erkrankungen, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen, sind die ADMA-Konzentrationen im Blut erhöht. Bei Dialysepatienten beispielsweise korrelieren die erhöhten ADMA Blutspiegel signifikant mit dem Ausmaß der Arteriosklerose und des kardiovaskulären Risikos. Erhöhte ADMA-Konzentrationen wurden u. a. bei Patienten mit Hypercholesterinämie, Hypertonie, Arteriosklerose, chronischer Niereninsuffizienz und chronischer Herzinsuffizienz nachgewiesen und mit einer eingeschränkten endothelabhängigen Vasodilatation in Zusammenhang gebracht.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Regulation von Gefäßtonus und -struktur durch Stickstoffmonoxid (NO) eine große klinische Bedeutung besitzt. Ferner wurde berichtet, dass menschliche Endothelzellen neben Stickstoffmonoxid auch ADMA produzieren, was auf eine endogene NO-Regulation durch ADMA im Endothel hinweist. Es wurde daher angenommen, dass das vielfache Auftreten von Hypertonie, Arteriosklerose und immunologischer Dysfunktion bei Patienten mit Niereninsuffizienz in engem Zusammenhang mit dem beeinträchtigten L-Arginin/NO-Stoffwechsel und der Akkumulation von ADMA steht. Der Mechanismus, durch welchen es zu einer veränderten L-Arginin-NO-Stoffwechsellage kommt, konnte bisher nur zum Teil geklärt werden. Sicherlich handelt es sich um eine multifaktorielle Erscheinung, die u. a. den Anstieg freier Sauerstoffradikale, die Akkumulation von ADMA und eine verminderte NO-Synthase-Aktivität beinhaltet.

Prospektive Studien in den letzten Jahren lassen ADMA als neuen kardiovaskulären Risikomarker bzw. -faktor zunehmend an Bedeutung gewinnen.

### Indikation

- Arteriosklerose
- Hypertonie
- Herzinsuffizienz
- Koronare Herzerkrankungen
- Hypercholesterinämie
- Niereninsuffizienz
- Diabetes mellitus
- Periphere arterielle Verschlusskrankheit

### 3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Kopplung des enthaltenen ADMA versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe mit einem polyklonalen ADMA-Antiserum in einer mit ADMA-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. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Antikörper aus der Bindung an den Tracer. Daher ist die Konzentration des an den Tracer gebundenen Antikörpers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die polyklonalen Anti-ADMA-Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift 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 Konzentration von ADMA in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Biotintracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K3001MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K3001MC	CFD	Zentrifugations-Filtereinheit	48 Stück
K3001ST	STD	Standards vorverdünnt in Reaktionspuffer	6 x 2 Fläschchen
K3001KO	CTRL 1+ CTRL 2	Kontrollen vorverdünnt in Reaktionspuffer	2 x 2 Fläschchen
K3001WP	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat (10-fach)	2 x 100 ml
K3001AK	AB	ADMA-Antikörper (lyophilisiert)	2 x 1 Reaktionsgefäß
K3001AVR	ABBUF	ADMA-Antikörper-Verdünnungspuffer (lyophilisiert)	4 x 80 mg
K3001K	2.AB	POD-Antikörper (Konzentrat)	120 µl
K3001CSP	2.ABDIL	Konjugatstabilisierungspuffer	24 ml
K3001RP	DERBUF	Reaktionspuffer	10 ml
K3001DR	DER	Derivatisierungsreagenz	4 x 10 mg
K3001LM	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1,5 ml
K3001SL	CODIL	Verdünnungspuffer für Kopplung (lyophilisiert)	2 x 5 ml
K3001TMB	SUB	TMB-Substrat	2 x 15 ml
K3001AC	STOP	Stopplösung	15 ml

## 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 14000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so je nach Probenaufkommen bis zu 4 x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL1, CTRL2)** sind bereits in **Reaktionspuffer (DERBUF)** verdünnt und werden bei -20°C gelagert. Für den Test werden die Standards und Kontrollen aufgetaut und können bis zu 3 mal wieder eingefroren werden. Das Wiedereinfrieren der Standards und Kontrollen sollte sofort nach Entnahme erfolgen.

- **DMSO** kristallisiert bei 4°C aus. Zum Lösen das DMSO im Wasserbad bei 20-25°C erwärmen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER) (10 mg)** wird in **300 µl DMSO** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontalschüttler gelegt. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Durch die Aufteilung des DER in 4 Gefäße ist der ELISA in vier Ansätze teilbar. Bitte beachten: **DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.**
- Der **Verdünnungspuffer für Kopplung (CODIL)** wird in 5 ml verdünntem **Waschpuffer** pro Fläschchen rekonstituiert (Gesamt-volumen: 2 x 5 ml = 10 ml). Der rekonstituierte Verdünnungspuffer für Kopplung ist bei 2-8°C mindestens 14 Tage haltbar. Durch die Aufteilung des CODIL in 2 Fläschchen ist der ELISA in 2 Ansätze teilbar bzw. 4 Ansätze innerhalb von 14 Tagen.
- Der **Antikörperverdünnungspuffer (ABBUF)** wird in **2,8 ml verdünntem Waschpuffer** pro Fläschchen rekonstituiert (Gesamt-volumen: 4 x 2,8 ml = 11,2 ml).
- Der **ADMA-Antikörper (AB)** wird in dem **rekonstituierten Antikörperverdünnungspuffer** gelöst. Hierzu wird der Inhalt jedes der 2 AB-Gefäße mit je 0,5 ml rekonstituiertem ABBUF gefüllt, 10 min inkubiert und gevortext. Diese Lösung (2 x 0,5 ml = 1,0 ml) wird vollständig in ein separates Gefäß überführt und mit dem restlichen Antikörperverdünnungspuffer (10,2 ml) aufgefüllt. Die ADMA-Antikörper-Lösung ist bei 2-8°C mindestens 14 Tage haltbar. Durch die Aufteilung des AB in 2 Fläschchen ist der ELISA in 2 Ansätze teilbar bzw. 4 Ansätze innerhalb von 14 Tagen.
- Der **POD-Antikörper (2.AB)** wird **1:200 in Konjugatstabilisierungspuffer (2.ABDIL)** verdünnt (110 µl 2.AB + 22 ml 2.ABDIL). Unverdünnter POD-Antikörper (2.AB) ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünnter POD-Antikörper (2.AB) ist bedingt stabil und kann 5 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei 2-8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zu Forschungszwecken.

- Standards und Kontrollen sind auf Humanplasma aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter  $H_2SO_4$ .  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht verwendet werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

### EDTA-Plasma und Serum

- Als Probe eignet sich venöses Nüchternblut. Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2-8°C eine Woche. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20°C aufbewahrt werden.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- **EDTA-Plasma- und Serumproben** werden unverdünnt verwendet.
- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem **DER** (Derivatisierungsreagenz) zur Kopplung des enthaltenen ADMA versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

### *Pipettierschema Probenvorbereitung*

<p>1. Je <b>300 µl gebrauchsfertigen Standard (STD)</b> bzw. <b>gebrauchsfertige Kontrolle (CTRL)</b> in je eine Zentrifugations-Filtereinheit (CFD) pipettieren</p> <p>Je <b>100 µl</b> von jeder <b>Probe (SAMPLE)</b> in eine Zentrifugations-Filtereinheit (CFD) pipettieren und mit <b>200 µl Reaktionspuffer (DERBUF)</b> auffüllen</p>
<p>2. <b>20-30 min</b> bei 14000 x g und 4°C <b>zentrifugieren</b> bis ca. <b>250 µl Filtrat</b> gesammelt ist; die restliche Lösung verbleibt in der Filtereinheit</p>

2 x 100 µl des Filtrats (Permeat) werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

### *Pipettierschema Testdurchführung*

<p>1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen</p>
<p>2. Positionen für Standard/Kontrolle /Probe (STD/CTRL/SAMPLE) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren</p>
<p>3. Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können in der verschlossenen Originalverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 4°C gelagert werden</p>
<p>4. Mikrotiterplattenstreifen <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer (WASHBUF)</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen</p>
<p>5. Je <b>100 µl gefilterten Standard (STD), Kontrolle (CTRL)</b> bzw. <b>Probe (SAMPLE)</b> in Doppelbestimmung in die Vertiefung der ELISA-Platte (PLATE) pipettieren</p>
<p>6. <b>10 µl</b> frisch angesetztes <b>Derivatisierungsreagenz (DER)</b> in alle Vertiefungen pipettieren und <b>sofort</b> auf einem Horizontalschüttler <b>30 min bei Raumtemperatur (18-26°C)</b> inkubieren</p>

7. <b>40 µl Verdünnungspuffer (CODIL)</b> pro Vertiefung zugeben
8. <b>5 min</b> auf Horizontalschüttler <b>bei Raumtemperatur (18-26°C)</b> inkubieren
9. <b>50 µl</b> verdünnter <b>ADMA-AK (AB)</b> pro Vertiefung pipettieren. Streifen luftdicht abdecken
10. Über Nacht ( <b>15-20 Stunden</b> ) bei <b>2-8°C</b> inkubieren
11. Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer (WASHBUF)</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von WASHBUF durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
12. <b>200 µl</b> verdünnten <b>POD-AK (2. AB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren
13. Streifen abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C)</b> unter Schütteln inkubieren
14. Inhalt der Platte verwerfen und <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer (WASHBUF)</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von WASHBUF durch mehrmaliges Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
15. <b>200 µl TMB-Substrat (SUB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren
16. <b>6-15 min bei Raumtemperatur (18-26°C)</b> im Dunkeln inkubieren*
17. <b>100 µl Stopplösung (STOP)</b> in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen
18. Extinktion <b>sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (alternativ 690 nm) messen. 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.

## 10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Bei einer Durchführung des Tests unter strikter Einhaltung der Volumenangaben für Standards, Kontrollen und Probenbehandlung (*Pipettierschema Probenvorbereitung*, Punkt 1) sind Standards, Kontrollen sowie Proben gleich verdünnt, deshalb wird **bei der Auswertung der Ergebnisse kein Verdünnungsfaktor mit berechnet**.

### Auswertungsfunktionen

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, wir empfehlen 0.01).

#### 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 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. 0.01).

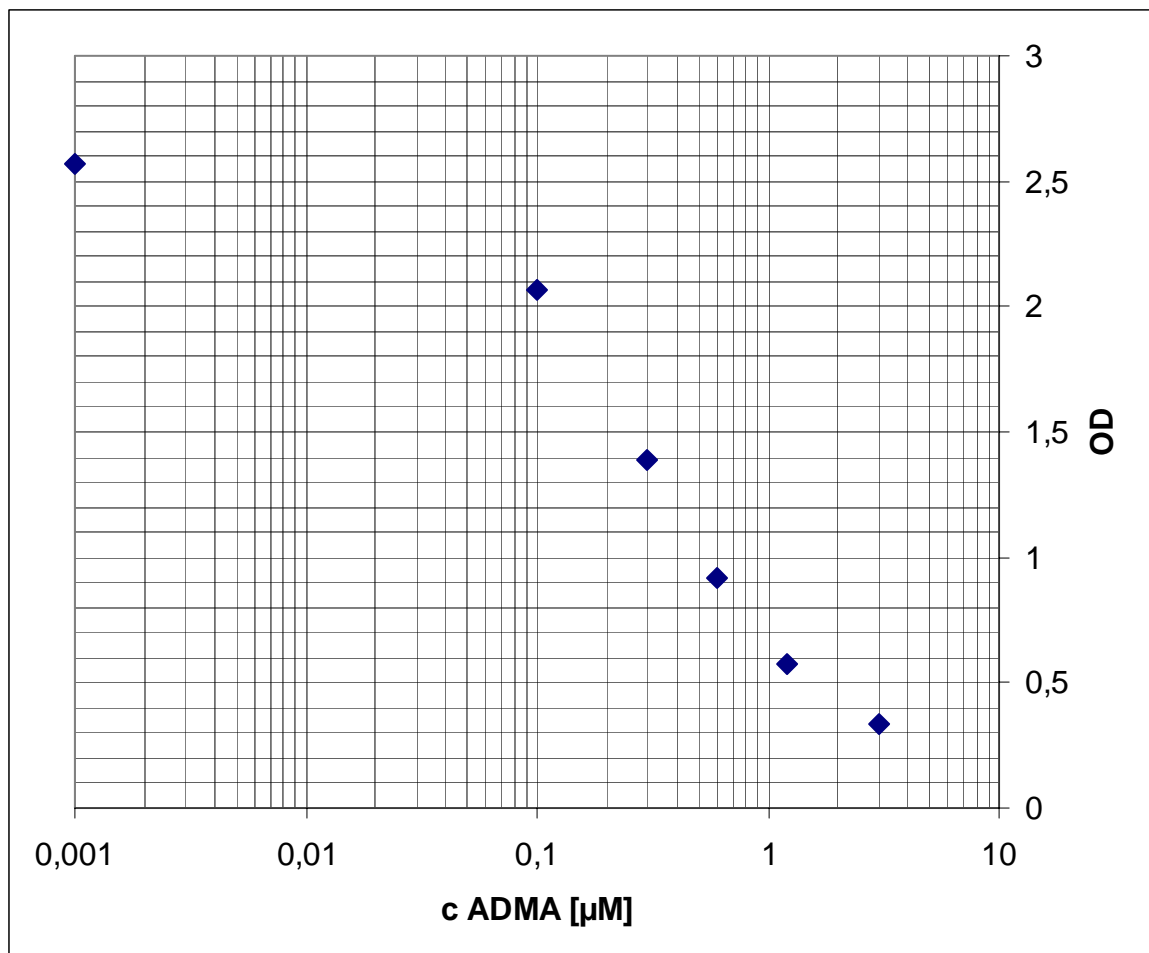
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

## Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Testansatz Kontrollen mitgeführt werden. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen ein oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

Die Konzentrationen der Kontrollen und Patientenproben können direkt aus der Kalibrierkurve in  $\mu\text{mol/l}$  abgelesen werden. Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.

## Musterkalibrierkurve



## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Kreuzreaktion*

SDMA &lt; 0,5 %

NMMA &lt; 0,5 %

L-Arginin &lt; 0,02 %

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

Intra-Assay (n=6)		
Probe	ADMA [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Standard- abweichung (SD)
1	0,62	0,079
2	1,10	0,115

Inter-Assay (n=6)		
Probe	ADMA [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Standard- abweichung (SD)
1	0,60	0,071
2	1,15	0,105

### *Sensitivität*

Die Nachweisgrenze wurde als  $B_0 + 1 \text{ SD}$  festgelegt. Gemessen wurde 6-mal der Standard Null.

Probe	ADMA Mittelwert [OD]	Standard- abweichung (SD)	Nachweis- grenze [ $\mu\text{mol/l}$ ]
Standard Null	3,00	0,2	0,05

### Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an ADMA wurden zu einer Serumprobe gegeben (Spike) und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von ADMA wurde bei 2 verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die theoretisch erwarteten Werte wurden dabei aus der Summe der gemessenen Konzentration in der Probe ohne Spike und der zugegebenen Menge ermittelt.

Spike [ $\mu\text{mol/l}$ ]	ADMA erwartet [ $\mu\text{mol/l}$ ]	ADMA gemessen [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Wiederfindung [%]
0	x	x=0,9	100
0,5	0,5+x=1,4	1,3	92,8
1,0	1,0+x=1,9	1,6	84,2

### Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 115 %.

Verdünnung	Messwert [ $\mu\text{M}$ ]	Erwartet [ $\mu\text{M}$ ]	Wiederfindung [%]
original	0,95	0,95	100
1+1	0,55	0,475	115
1+2	0,40	0,316	127

## 12. EINSCHRÄNKUNGEN

Stark hämolysierte oder lipämische Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Wir empfehlen solche Proben nicht zu analysieren.

### 13. LITERATUR

1. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572 - 575
2. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: Relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999; 10: 594 - 600
3. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tangphao O, Tsao PS, Chan JR, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98: 1842 - 1847
4. Stühlinger M, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *J. Am. Med. Assoc.* 2002; 287: 1420-1426
5. Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich JC, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase predicts mortality in end-stage renal disease (ESRD). *Lancet* 2001; 358: 2113-2117
6. Nijveldt RJ, Teerlink T, Van der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, van Leeuwen PA. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin. Nutr.* 2003; 22: 23-30
7. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, Nicolaidis KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003; 361: 1511-1517
8. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc. Res.* 2003; 59: 824-833
9. Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2003; 24: 1912-1919.

## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur in-vitro-Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden (Haltbarkeitsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

16.05.2008

### Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

# ADMA *direct* (mouse/rat) ELISA Kit

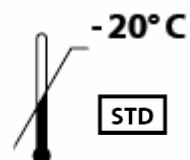
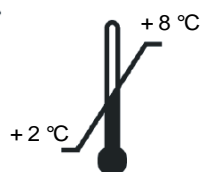
*For the determination of ADMA in EDTA-plasma and serum  
For animal experimental studies  
(not suitable for human samples)*

For research use only

Valid from 01.08.2008



K 3001



STD



## **1. INTENDED USE**

The ADMA ELISA Kit is intended for the quantitative determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in EDTA-plasma and serum from mouse and rat. It is for research use only.

## **2. INTRODUCTION**

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of NO-synthase. It is formed during proteolysis of methylated proteins and removed by renal excretion or metabolic degradation by the enzyme dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH). Several celltypes, including human endothelial and tubular cells are capable of synthesizing and metabolizing ADMA. Elevated ADMA concentrations in the blood are found in numerous diseases associated with endothelial dysfunction. For example, elevated ADMA levels in blood of dialysis patients correlate significantly with the degree of arteriosclerosis and cardiovascular risk. Furthermore, elevated ADMA levels are found in patients with hypercholesterolemia, hypertension, arteriosclerosis, chronic renal failure and chronic heart failure, and are associated with restrictions in endothelial vasodilatation.

During the last years, the important clinical relevance of the regulation of vascular tone and structure by nitric oxide (NO) has been shown. Moreover, there were reports that human endothelial cells produce ADMA as well as nitric oxide, which points to an endogenous endothelial NO-regulation by ADMA. Therefore it was assumed that hypertension, arteriosclerosis and immunological dysfunction in patients with chronic renal failure are connected to a dysfunction of the L-arginin/NO-metabolism and to ADMA accumulation. The reasons for the deregulation of the L-arginin/NO-metabolism could only partially be elucidated. Certainly, there are multiple factors involved in the L-arginin/NO-metabolism regulation as for example elevation of free superoxid radicals ( $O_2^-$ ), ADMA accumulation and reduced NO-synthase activity.

Prospective clinical studies of the last years demonstrate the increased importance of ADMA as a novel cardiovascular risk factor.

**Indication**

- Arteriosclerosis
- Hypertension
- Chronic heart failure
- Coronary artery disease
- Hypercholesterolemia
- Chronic renal failure
- Diabetes mellitus
- Peripheral arterial occlusive disease

**3. PRINCIPLE OF THE TEST**

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. The sample preparation includes the addition of an acylation-reagent for ADMA coupling. Afterwards, the treated samples and the polyclonal ADMA-antiserum are incubated in wells of microplate coated with ADMA-derivative (tracer). During the incubation period, the target ADMA in the sample competes with the tracer immobilized on the wall of the microtiter wells for the binding of the polyclonal antibodies. The ADMA in the sample displaces the antibodies out of the binding to the tracer. Therefore the concentration of the tracer-bound antibody is inverse proportional to the ADMA concentration in the sample. During the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well to detect the anti-ADMA antibodies. After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a substrate for peroxidase. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The color changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the ADMA concentration in the sample; this means high ADMA 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 standard. ADMA present in the patient samples is determined directly from this curve.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Content	Kit Components	Quantity
K3001MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K3001MC	CFD	Centrifugal filter device	48 devices
K3001ST	STD	Standards (diluted in reaction buffer)	6 x 2 vials
K3001KO	CTRL 1+ CTRL 2	Controls (diluted in reaction buffer)	2 x 2 vials
K3001WP	WASHBUF	Wash buffer concentrate (10 fold)	2 x 100 ml
K3001AK	AB	ADMA antibody (lyophilized)	2 x 1 vial
K3001AVR	ABBUF	ADMA antibody dilution buffer (lyophilized)	4 x 80 mg
K3001K	2.AB	POD antibody (concentrate)	120 µl
K3001CSP	2.ABDIL	Conjugate stabilizing buffer	24 ml
K3001RP	DERBUF	Reaction buffer	10 ml
K3001DR	DER	Acylation reagent	4 x 10 mg
K3001LM	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1,5 ml
K3001SL	CODIL	Dilution buffer for coupling (lyophilized)	2 x 5 ml
K3001TMB	SUB	TMB substrate	2 x 15 ml
K3001AC	STOP	Stop solution	15 ml

## 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidist.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000  $\mu$ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 14000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm  
(reference wave length 620 or 690 nm)

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100  $\mu$ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **Wash buffer concentrate (WASHBUF)** should be diluted with aqua bidist. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidist.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- **Standards (STD) and Controls (CTRL1, CTRL2)** are already diluted in the **reaction buffer (DERBUF)**. Store Standards and Controls frozen at -20°C, thaw before use in the test, and re-freeze immediately after use. Standards and Controls can be re-frozen up to 3 times.
- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at 20-25°C in a water bath.

- The content of one vial of **acylation reagent (DER) (10 mg)** must be dissolved in **300 µl DMSO**. Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. After use, the rest of the reagent should be discarded. DER must be **prepared immediately before use**. The ELISA kit can be separated into four performances by the four DER vials. Please note: **DMSO attacks all plastics but not dispenser tips and laboratory glass**.
- The **dilution buffer for coupling (CODIL)** must be reconstituted in 5 ml diluted **wash buffer** per vial (total volume: 2 x 5 ml = 10 ml). The reconstituted dilution buffer for coupling is stable for at least 14 days after reconstitution. The ELISA kit can be separated into two performances because of the two AB vials or even into four determinations within 14 days.
- The **antibody dilution buffer (ABBUF)** must be reconstituted in **2,8 ml** of diluted **wash buffer** per vial (total volume 4 x 2,8 ml = 11,2 ml).
- The **ADMA antibody (AB)** must be dissolved in the **reconstituted antibody dilution buffer**. Therefore, each of the 2 AB vials must be reconstituted with 0,5 ml of diluted antibody dilution buffer. Incubate for 10 min, vortex, transfer the obtained solution (2 x 0,5 ml = 1,0 ml) quantitatively into a separate vial and add the residual antibody dilution buffer (10,2 ml). The ADMA antibody solution is stable for at least 14 days after reconstitution. The ELISA kit can be separated into 2 performances because of the 2 AB vials or even into 4 determinations within 14 days.
- The **POD antibody (2.AB)** must be diluted **1:200** in **conjugate stabilizing buffer (2.ABDIL)** (110 µl 2.AB + 22 ml 2.ABDIL). The undiluted POD antibody (2.AB) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted POD antibody (2.AB) is not stable over a longer period. It can be stored at 2-8°C for only 5 days.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at 2-8°C.

## 7. PRECAUTIONS

- For research use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV and Hepatitis B. However, for safety reasons, all kit components should be treated as if potentially infectious.

- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

## **8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

### **EDTA-plasma and serum**

- Venous fasting blood is suited for this test system. Samples are stable for one week at 2-8°C. For longer storage samples should be frozen at -20°C up to the measurement.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- The **EDTA-plasma and serum** samples are analyzed without any dilution.
- For sample preparation, a DER for coupling of ADMA is added (details are given in the sample preparation procedure).

## **9. ASSAY PROCEDURE**

### **Procedural notes**

- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

*Sample preparation procedure*

<p>1. Pipette <b>300 µl</b> of each, <b>ready-to-used standards (STD)</b> or <b>ready-to-used standards controls (CTRL)</b>, into a centrifugal filter device (CFD)</p> <p>Pipette <b>100 µl</b> of each sample (<b>SAMPLE</b>) into a centrifugal filter device (CFD) and add <b>200 µl</b> of <b>reaction buffer (DERBUF)</b></p>
<p>2. <b>Centrifuge for 20-30 min</b> at 14000 x g and 4°C until appr. <b>250 µl filtrate</b> are collected; the residual solution remains in the centrifugal filter device</p>

2 x 100 µl of each filtrate (permeate) is used in the ELISA in duplicate.

*Test procedure*

<p>1. Bring all reagents and samples to room temperature (18-26°C)</p>
<p>2. Mark the positions of <b>standards (STD)/controls (CTRL)/ samples (SAMPLE)</b> in duplicate on a protocol sheet</p>
<p>3. Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips in the closed original package bag at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label</p>
<p>4. Wash each well <b>5 times</b> by dispensing <b>250 µl</b> of diluted <b>Wash buffer (WASHBUF)</b> into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate (PLATE) should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution</p>
<p>5. Add <b>100 µl</b> of <b>filtered standards (STD)/ controls (CTRL)/samples (SAMPLE)</b> in duplicate to the wells of the ELISA plate (PLATE)</p>
<p>6. Add <b>10 µl</b> of freshly prepared <b>acylation reagent (DER)</b> to all wells and incubate <b>immediately for 30 min</b> on a <b>horizontal mixer</b> at <b>room temperature (18-26°C)</b></p>
<p>7. Add <b>40 µl</b> <b>dilution buffer (CODIL)</b> to each used well of the ELISA plate (PLATE)</p>

8. Incubate for <b>5 min at room temperature (18-26°C)</b> on a horizontal mixer
10. Add <b>50 µl</b> diluted <b>ADMA antibody (AB)</b> into each well and cover the plate tightly
11. Incubate over night ( <b>15-20 hours</b> ) at <b>2-8°C</b>
9. Aspirate the contents of each well. Wash <b>5 times</b> by dispensing <b>250 µl</b> of diluted <b>Wash buffer (WASHBUF)</b> into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate (PLATE) should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
10. Add <b>200 µl</b> diluted <b>POD antibody (2. AB)</b> into each well
11. Cover plate tightly and incubate for <b>1 hour at room temperature (18-26°C)</b> on a horizontal mixer
12. Aspirate the contents of each well. Wash <b>5 times</b> by dispensing <b>250 µl</b> of diluted <b>Wash buffer (WASHBUF)</b> into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution
13. Add <b>200 µl</b> of <b>TMB substrate (SUB)</b> into each well
14. Incubate for <b>6-15 min at room temperature (18-26°C)</b> in the dark*
15. Add <b>100 µl</b> of <b>stop solution (STOP)</b> into each well, mix thoroughly
16. Determine absorption <b>immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (alternatively at 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 as a reference

\*The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

## 10. EVALUATION OF RESULTS

If the test is performed in strict compliance with the manufacturer's instructions, e.g. with the exact volumes for standards, controls and samples/sample treatment (*Sample preparation procedure*, Point 1), standards, controls and samples are equally diluted. Therefore, **no dilution factor is required for calculation of the results.**

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use 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 calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

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 logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

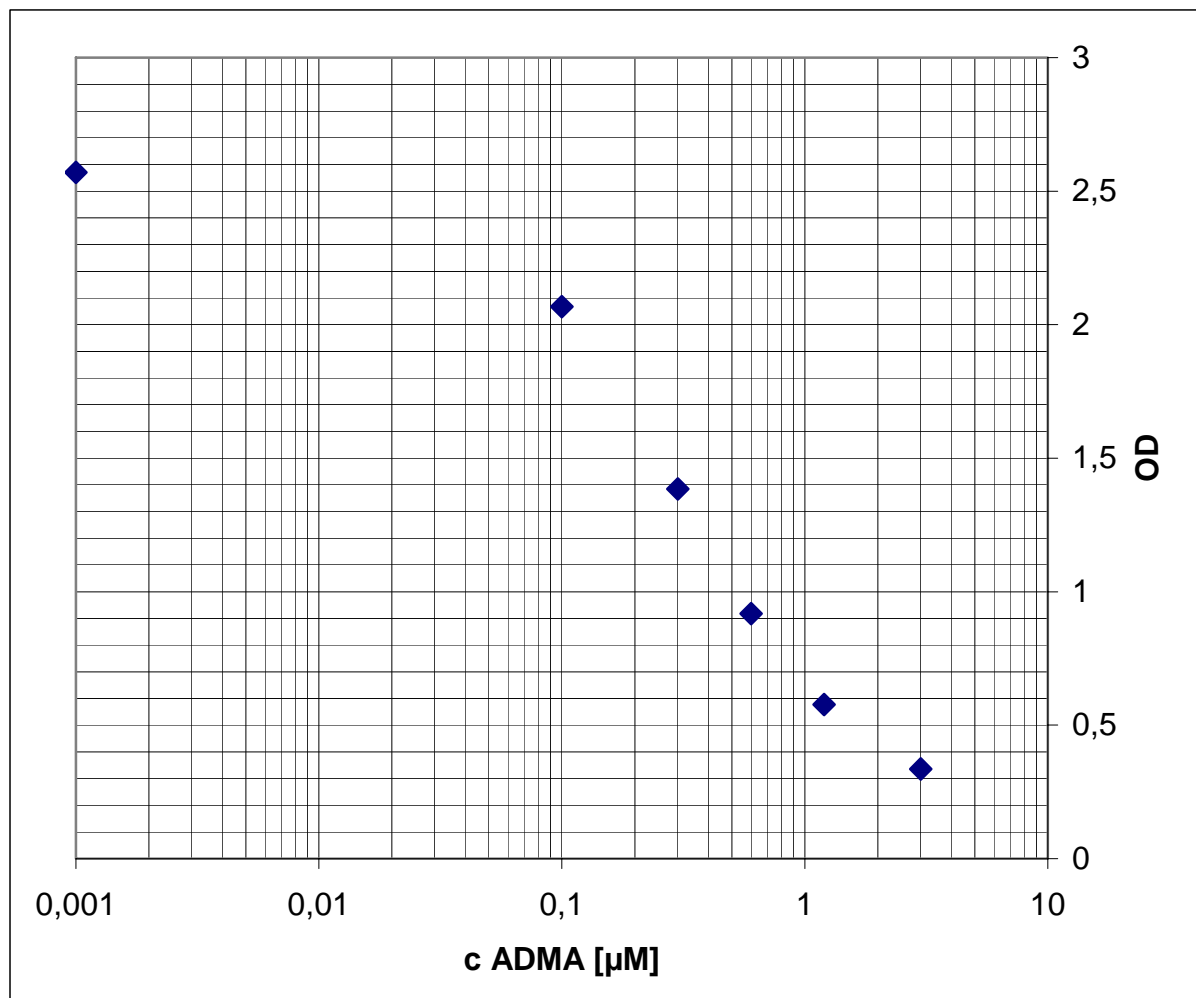
The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

## Controls

Control samples or serum pools should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of the 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 sample are outside the acceptable limits.

The concentration of controls and patient samples can be determined directly from calibration curve. In the following an example of a calibration curve is given.

## Example of calibration curve



## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Cross reactivity*

SDMA &lt; 0,5 %

NMMA &lt; 0,5 %

L-Arginin &lt; 0,02 %

### *Precision and reproducibility*

Intra-Assay (n=6)		
Sample	ADMA [μmol/l]	Standard variation (SD)
1	0,62	0,079
2	1,10	0,115

Inter-Assay (n=6)		
Sample	ADMA [μmol/l]	Standard variation (SD)
1	0,60	0,071
2	1,15	0,105

### *Sensitivity*

The sensitivity was set as  $B_0 + 1SD$ . The zero-standard was measured 6 times.

Sample	ADMA mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [μmol/l]
0	3,00	0,2	0,05

### Recovery

Samples were spiked with 2 different ADMA concentrations and measured using this assay. The analytical recovery rate was determined by the expected and measured ADMA levels. The expected levels were calculated as the sum of the measured ADMA concentration in the original sample and the spiked ADMA amount.

Spike [ $\mu\text{mol/l}$ ]	ADMA expected [ $\mu\text{mol/l}$ ]	ADMA measured [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Recovery [%]
0	x	x=0,9	100
0,5	0,5+x=1,4	1,3	92,8
1,0	1,0 +x=1,9	1,6	84,2

### Linearity

The linearity of the ELISA was determined by the dilution of a spiked patient sample. The mean linearity was 115%.

Dilution	Measured [ $\mu\text{M}$ ]	Expected [ $\mu\text{M}$ ]	Recovery %
original	0,95	0,95	100
1+1	0,55	0,475	115
1+2	0,40	0,316	127

## 12. LIMITATIONS

Strong haemolytic and lipaemic samples often show wrong concentrations. Do not to measure haemolytic and lipaemic samples.

### 13. REFERENCES








1. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572 – 575
2. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: Relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999; 10: 594 – 600
3. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tangphao O, Tsao PS, Chan JR, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98: 1842 – 1847
4. Stühlinger M, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *J. Am. Med. Assoc.* 2002; 287: 1420-1426
5. Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich JC, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase predicts mortality in end-stage renal disease (ESRD). *Lancet* 2001; 358: 2113-2117
6. Nijveldt RJ, Teerlink T, Van der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, van Leeuwen PA. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin. Nutr.* 2003; 22: 23-30
7. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaidis KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003; 361: 1511-1517
8. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc. Res.* 2003; 59: 824-833
9. Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2003; 24: 1912-1919.

## 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for in-vitro-diagnostic use only.
- Reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed können or exchanged.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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 wrong use.

01.08.2008

### Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	For research use only		Contains sufficient for <n> tests
	Manufacturer		Use by
	Lot number		