

ADMA Xpress ELISA Kit

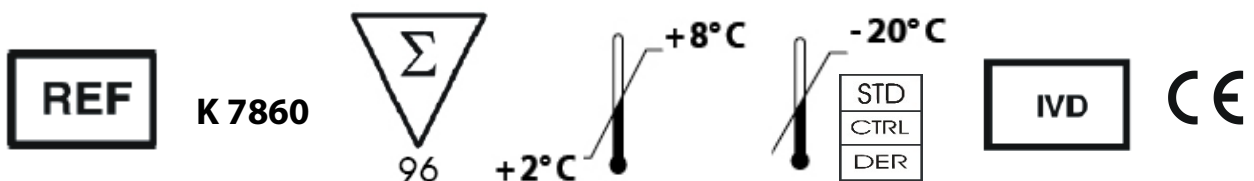
Zur Bestimmung von ADMA in humanem EDTA-Plasma und Serum

For the determination of ADMA in human EDTA plasma and serum

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Gültig ab / Valid from 24.04.2014



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

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von asymmetrischem Dimethyl-L-Arginin (ADMA) in humanem EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG / KLINISCHE RELEVANZ

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.

Indikationen

- Arteriosklerose
- Hypertonie
- Herzinsuffizienz
- Koronare Herzerkrankungen

- Hypercholesterinämie
- Niereninsuffizienz
- Diabetes mellitus
- Periphere arterielle Verschlusskrankheit

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K7860MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K7860ST	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 2,0 µM)	6 x 200 µl
K7860KO1 K7860KO2	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 200 µl
K7860WP	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K7860K	CONJ	POD-Konjugat (Konzentrat, 200x)	65 µl
K7860KV	CONJBUF	Konjugatstabilisierungspuffer, gebrauchsfertig	13 ml
K7860RP	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	12 ml
K7860DR	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	2 Fläschchen
K7860LM	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	3 ml
K7860SL	CODIL	Verdünnungspuffer nach Derivatisierung, gebrauchsfertig	18 ml
K7860TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K7860AC	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

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 mit Filter 450 oder 405nm

* 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. 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 2x 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 Reinstwasser verdünnt werden (**100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser**), 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)** werden eingefroren bei **-20°C** gelagert. Für den Test die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Standards und Kontrollen können bis zu 3x wieder eingefroren werden, das Wiedereinfrieren sollte sofort nach Entnahme erfolgen.
- Der **Reaktionspuffer (REABUF)** wird bei **4°C** gelagert. Für den Test den Reaktionspuffer auf Raumtemperatur bringen und eventuell aufgetretene Kristalle lösen lassen.
- **DMSO** kristallisiert bei 4°C aus. Zum Lösen das DMSO bei Raumtemperatur stehen lassen oder im Wasserbad erwärmen.

- Das **Derivatisierungsreagenz (DER)** wird bei **-20°C** gelagert. Vor dem Öffnen auf Raumtemperatur bringen. Zum Rekonstituieren die auf dem Etikett angegebene Menge an **DMSO** zugeben und mit dem Vortex-Mixer mehrere Sekunden mischen, 10 min stehen lassen und zwischendurch vortexen. Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Falls mehrere Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die Aufteilung des DER in zwei Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. **Bitte beachten:** DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Das **Peroxidase-Konjugat (CONJ)** wird **1:200** in Konjugatstabilisierungspuffer (CONJBUF) verdünnt (z.B. **60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF**; nur die benötigte Menge ansetzen). Unverdünntes Konjugat ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünntes Konjugat kann **1 Woche 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.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

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.
- Proben mit sichtbaren Mengen an Feststoff sollten zentrifugiert werden.
- EDTA-Plasma- und Serumproben werden **unverdünnt** verwendet. Falls eine Probe doch verdünnt werden soll, muss dafür der Nullstandard (STD1) verwendet werden.
- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen ADMA versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen ADMA versetzt. Außerdem wird ein Reaktionspuffer zugegeben, welcher ADMA-Derivat (Tracer) enthält.

Anschließend wird die so vorbereitete Probe in einer ELISA-Platte inkubiert, welche mit einem polyklonalen Antikörper gegen ADMA-Derivat beschichtet ist. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem Tracer um die Bindung an die polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Tracer aus der Bindung an den Antikörper. Daher ist die Konzentration des an den Antikörper gebundenen Tracers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an den Tracer bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat 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 des an den Antikörper gebundenen Tracers 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.

Pipettierschema Probenvorbereitung

Die Derivatisierung der Standards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der Proben (SAMPLE) wird als Einzelbestimmung in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäße) wie folgt durchgeführt:

- | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15-30°C) bringen, gut mischen. |
| 2. Je 25 µl Standard (STD) , 25 µl Kontrolle (CTRL) bzw. 25 µl Probe (SAMPLE) in Mikroreaktionsgefäße pipettieren. |
| 3. 200 µl Reaktionspuffer (REABUF) in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren. |

4. **25 µl** frisch angesetztes **Derivatisierungsreagenz (DER)** in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren und **gründlich mischen** (z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexten). Anschließend auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) **30 min** bei **Raumtemperatur** (15-30°C) inkubieren.

2 x 50 µl der so vorbereiteten Proben (STD, CTRL, SAMPLE) werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

Pipettierschema Testdurchführung

5. Positionen für Standards/ Kontrollen/ Proben (STD/ CTRL/ SAMPLE) in Doppelbestimmungen in einem **Protokollblatt** markieren.
6. Benötigte **Mikrotiterstreifen (PLATE)** aus dem Kit nehmen. Den Folienbeutel vor dem Öffnen auf Raumtemperatur bringen, um Kondensation in den Wells zu vermeiden. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können im wieder verschlossenen Folienbeutel mit Trockenmittel bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden.
7. Mikrotiterstreifen **5 x mit je 250 µl** verdünntem **Waschpuffer** waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8. **150 µl Verdünnungspuffer (CODIL)** in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren.
9. **2 x 50 µl** der vorbereiteten, **derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
10. Platte abdecken und **2 Stunden** bei **Raumtemperatur** (15-30°C) auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) inkubieren.
11. Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem **Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
12. **100 µl** verdünntes **Peroxidase-Konjugat (CONJ)** in alle Vertiefungen pipettieren.

13. Platte abdecken und 30 min bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln (180-240 rpm) inkubieren.
14. Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von WASHBUF durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
15. 100 µl TMB-Substrat (SUB) in alle Vertiefungen pipettieren.
16. 8-12 min bei Raumtemperatur (15-30°C) im Dunkeln inkubieren*
17. 100 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus mischen.
18. 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 gelesen. 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.

8. ERGEBNISSE

Bei einer Durchführung des Tests unter strikter Einhaltung der Volumenangaben für Standards, Kontrollen und Probenbehandlung sind Standards, Kontrollen und Proben gleich verdünnt, deshalb wird bei der Auswertung der Ergebnisse **kein Verdünnungsfaktor mitberechnet**.

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.

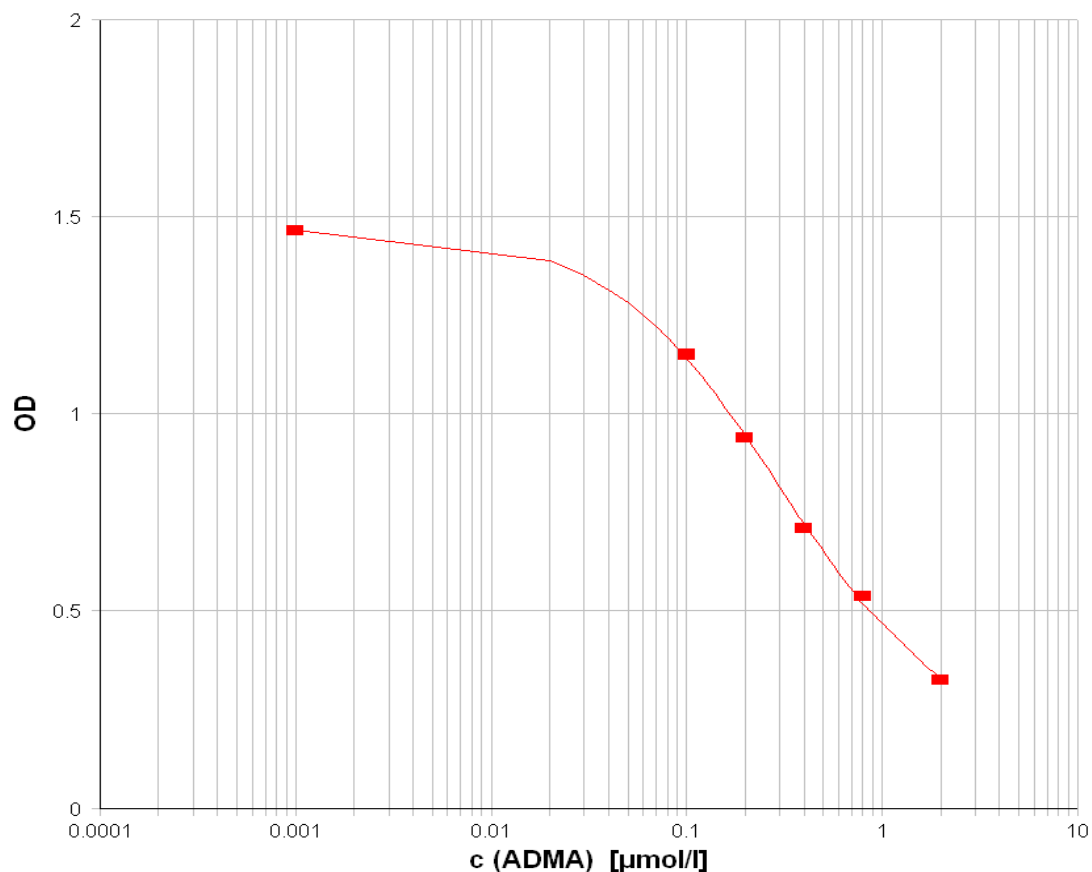
3. Gewichtete Spline-Funktion

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.

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. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

Musterkalibrierkurve



9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

Proben mit einer ADMA-Konzentration größer dem größten Standard können mit Standard 1 (= 0 nmol/l) verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

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 Plasma-Proben von augenscheinlich gesunden Personen (n=70) wurde ein Mittelwert von 0,45 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung von 0,095 µmol/l.

Plasma-Mittelwert ± 2 Standardabweichungen **0,45 ± 0,19 µmol/l**

Normalbereich: **0,26 – 0,64 µmol/l**

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=12)

Probe	ADMA [µmol/l]	VK [%]
1	0,19	7,9
2	0,48	5,8

Inter-Assay (n=6)

Probe	ADMA [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	0,19	10,8
2	0,47	7,6

Spike-Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an ADMA wurden zu einer Plasmaprobe gegeben (Spike) und anschließend im ELISA gemessen. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Plasmaprobe betrug 103,8 % (n=10).

Spike [$\mu\text{mol/l}$]	ADMA erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	ADMA gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
0		0,365	
0,32	0,685	0,732	106,9
0,55	0,915	0,921	100,7

Wiederfindung in der Verdünnung

Eine mit ADMA gespike Plasmaprobe wurde mit Standard 1 (Nullstandard) verdünnt. Die mittlere Wiederfindung betrug 96,7 % (n=10).

Verdünnung	ADMA erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	ADMA gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
original		1,275	
1:2	0,638	0,567	88,9
1:3	0,425	0,456	107,2
1:4	0,319	0,300	94,0

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 - 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 46 x der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von $0,04 \mu\text{mol/l}$.

Probe	ADMA Mittelwert [OD]	2 Standardabweichungen (2 x SD)	Nachweisgrenze [$\mu\text{mol/l}$]
Standard Null	2,2	0,14	0,04

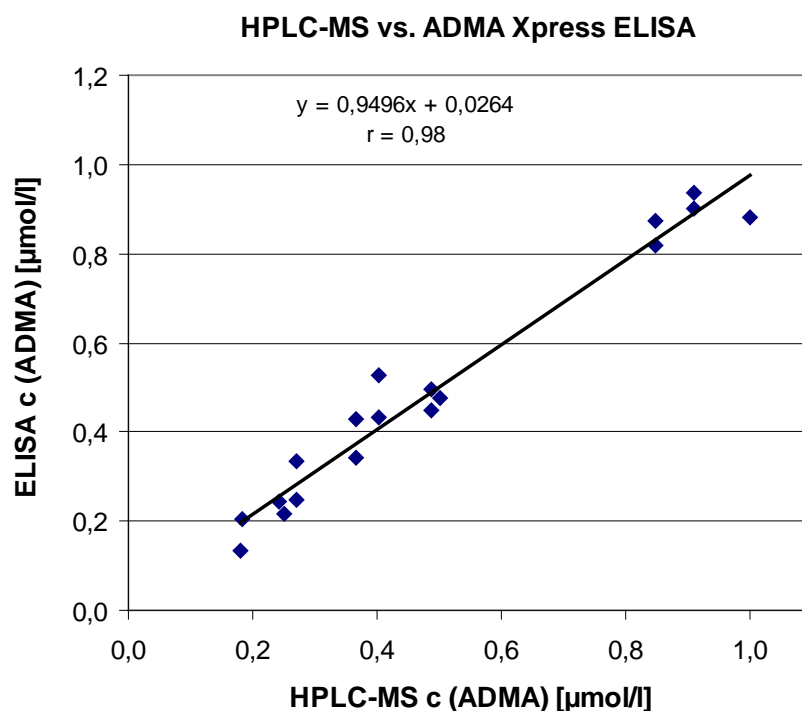
Spezifität

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

L-Arginin	< 0,02 %
SDMA	< 0,6 %

Korrelation mit HPLC-MS

Die Korrelation mit HPLC-MS wurde anhand von 13 Proben ermittelt, sie betrug $r = 0,98$.



12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen 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 Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal 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 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.

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, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums 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.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten 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 Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immunodiagnostik 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 Immunodiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

- 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
- 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
- Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc. Res.* 2003; **59**: 824-833
- 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.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Hersteller		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		

Manual

ADMA Xpress ELISA Kit

For the determination of ADMA in human EDTA plasma and serum

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Valid from 24.04.2014

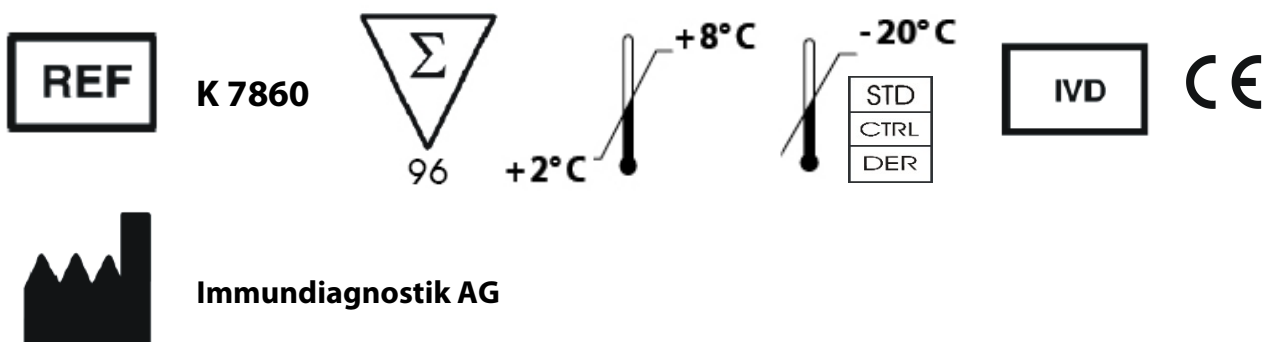


Table of Contents

1. INTENDED USE	19
2. INTRODUCTION / CLINICAL RELEVANCE	19
3. MATERIAL SUPPLIED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	21
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	22
7. ASSAY PROCEDURE	22
<i>Principle of the test</i>	22
<i>Sample preparation procedure</i>	23
<i>Test procedure</i>	23
8. RESULTS	25
9. LIMITATIONS	26
10. QUALITY CONTROL	26
<i>Reference Range</i>	27
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	27
<i>Precision and reproducibility</i>	27
<i>Spiking Recovery</i>	27
<i>Dilution Recovery</i>	28
<i>Analytical Sensitivity</i>	28
<i>Specificity</i>	29
<i>Correlation with HPLC-MS</i>	29
12. PRECAUTIONS	29
13. TECHNICAL HINTS	30
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	30
15. REFERENCES	31

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of asymmetric dimethyl arginine (ADMA) in human EDTA plasma and serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION / CLINICAL RELEVANCE

Asymmetric dimethyl arginine (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 dimethylargininedimethylaminohydrolase (DDAH). Several cell types, 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-arginine/NO-metabolism and to ADMA accumulation. The reasons for the deregulation of the L-arginine/NO-metabolism could only partially be elucidated. Certainly, there are multiple factors involved in the L-arginine/NO-metabolism regulation as for example elevation of free superoxide 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. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K7860MTP	PLATE	Holder with pre-coated strips	12 x 8 wells
K7860ST	STD	Standards, ready to use (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 2.0 μ M)	6 x 200 μ l
K7860KO1 K7860KO2	CTRL 1 CTRL 2	Controls, ready to use (see specification for range)	2 x 200 μ l
K7860WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K7860K	CONJ	POD conjugate (concentrate, 200x)	65 μ l
K7860KV	CONJBUF	Conjugate stabilizing buffer, ready to use	13 ml
K7860RP	REABUF	Reaction buffer, ready to use	12 ml
K7860DR	DER	Derivatization reagent, lyophilized	2 vials
K7860LM	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	3 ml
K7860SL	CODIL	Dilution buffer after derivatization, ready to use	18 ml
K7860TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K7860AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 μ l tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex

- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm or 405 nm

* 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. 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 2 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- Dilute the **ELISA wash buffer concentrate (WASHBUF)** with ultra pure water **1:10** before use (**100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water**), mix well. Crystals may occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution. The WASHBUF 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**.
- Store **standards (STD) and controls (CTRL1, CTRL2)** frozen at **-20°C**, thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls immediately after use. They can be re-frozen up to 3 times.
- Store **reaction buffer (REABUF)** at **4°C**. Bring to room temperature before use and dissolve occurring crystals.
- **DMSO** could crystallize at 4°C. Dissolve the crystals at room temperature or in a water bath.
- Store the **derivatization reagent (DER)** at **-20°C**. Bring to room temperature before opening. Dissolve the content of one vial in **DMSO** as stated on the label. Allow the content of the vial to dissolve for 10 min and mix thoroughly with a vortex-mixer. DER must be **prepared immediately before use**. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Discard any rest of the reagent after use. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two DER vials. **Please note:** DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.

- Dilute the **peroxidase conjugate (CONJ) 1:200** with conjugate stabilizing buffer (CONJBUF) (e.g. **60 µl CONJ + 12 ml CONJBUF**, prepare only the required amount). The undiluted POD conjugate is stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted POD conjugate can be stored at **2-8°C for 1 week**.
- All other test reagents are ready for use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA plasma and serum

- Venous fasting blood is suited for this test system. Blood samples are stable for one week at 2-8°C. For longer storage samples should be frozen at -20°C.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged.
- EDTA plasma and serum samples are analyzed **undiluted**. If dilution of a sample is required use STD1 (zero-standard) as diluent.
- For sample preparation a derivatization reagent (DER) for derivatization of ADMA is added (details are given in the sample preparation procedure).

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. The sample preparation includes the addition of a derivatization reagent for ADMA derivatization, and a reaction buffer is added containing ADMA-derivative (tracer).

Afterwards, the treated samples are incubated in wells of a microtiter plate coated with a polyclonal antibody against ADMA-derivative. During the incubation period the target ADMA in the sample competes with the tracer for the binding of the polyclonal antibodies immobilized on the wall of the microtiter wells. The ADMA in the sample displaces the tracer out of the binding to the antibodies. Therefore, the concentration of the antibody-bound tracer is inverse proportional to the ADMA concentration in the sample.

During the second incubation step a peroxidase conjugate is added to each microtiter well to detect the tracer. 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 color changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in a 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 antibody-bound tracer 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. ADMA present in the patient samples is determined directly from this curve.

Sample preparation procedure

Derivatization of standards (STD), controls (CTRL) and samples (SAMPLE) is carried out in single analysis in vials (e.g. 1.5 ml vials) as follows:

1. Bring all reagents and samples to **room temperature (15-30°C)** and mix well.
2. Add **25 µl of standards (STD), 25 µl of controls (CTRL) and 25 µl of samples (SAMPLE)** in the corresponding vials.
3. Add **200 µl of reaction buffer (REABUF)** into each vial (STD, CTRL, SAMPLE).
4. Add **25 µl** of freshly prepared **derivatization reagent (DER)** into each vial (STD, CTRL, SAMPLE) and **mix thoroughly** by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate on a horizontal shaker (180-240 rpm) **for 30 min at room temperature (15-30°C)**.

2 x 50 µl of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE) are used in the ELISA as duplicates.

Test procedure

5. Mark the positions of standards (STD)/ controls (CTRL)/samples (SAMPLE) in duplicate on a **protocol sheet**.

6. Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Always allow foil pouch to equilibrate to room temperature before opening to avoid condensation on the coated microwells. Replace the remainder in the foil pouch with desiccant and reseal. Store at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.
7. Wash the microtiter strips 5x with 250 µl of diluted ELISA wash buffer before use . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8. Add 150 µl of dilution buffer (CODIL) into each well of the microtiter plate.
9. For the analysis in duplicate, take 2 x 50 µl of the derivatized standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE) out of the vials and add into the respective wells.
10. Cover the plate and incubate for 2 hours at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).
11. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 x with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
12. Add 100 µl of diluted peroxidase conjugate (CONJ) into each well.
13. Cover the plate and incubate for 30 min at room temperature (15-30°C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).
14. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 x with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
15. Add 100 µl of TMB substrate (SUB) into each well.
16. Incubate for 8-12 min at room temperature (15-30°C) in the dark*.
17. Add 100 µl of stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly.

18. 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 color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

If the test is performed in strict compliance with the manufacturer's instructions (i.e. with the exact volumes for standards, controls, samples, and with correct sample treatment), standards, controls, and blood samples are equally diluted. Therefore, **no dilution factor is required for the calculation of 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 calibrator 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.

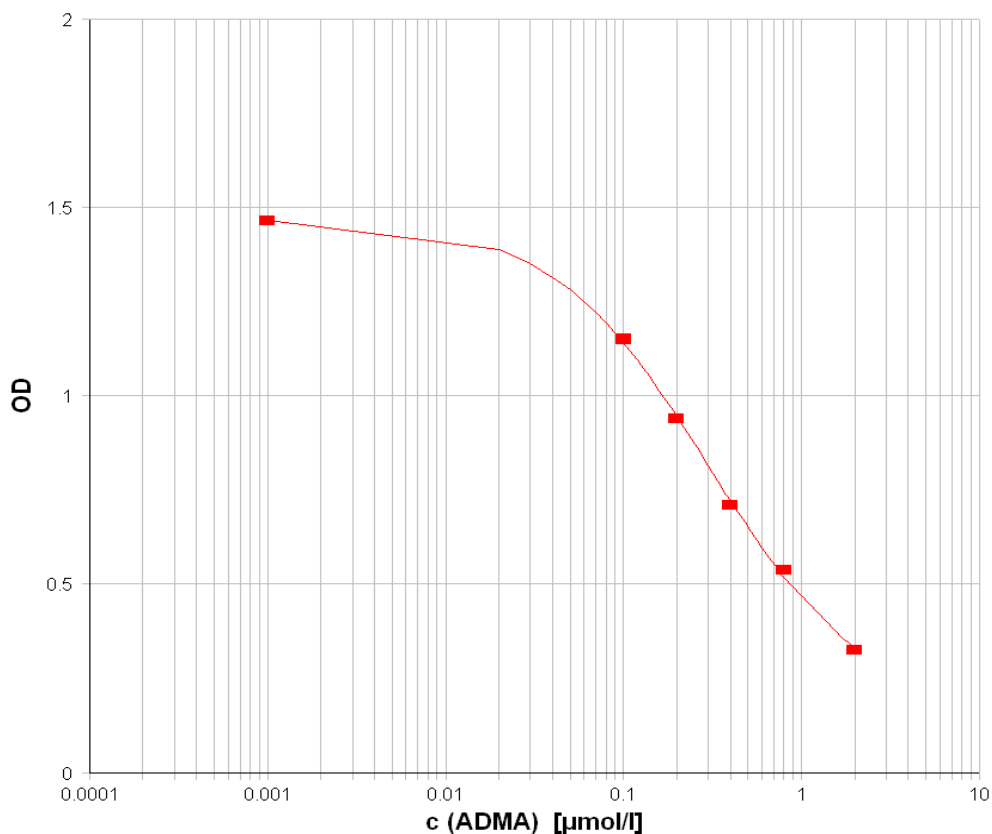
3. Spline algorithm

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available within the used program, the duplicate values should be evaluated manually.

The concentration of controls and patient samples can be determined directly from the calibration curve in $\mu\text{mol/l}$. In the following, an example of a calibration curve is given; do not use it for the calculation of your results.

Example of calibration curve



9. LIMITATIONS

Hemolytic and lipemic samples may give erroneous results. Do not measure hemolytic and lipemic samples.

Samples with concentrations above the measurement range can be diluted in Standard 1 (zero-standard) and re-assayed.

10. QUALITY CONTROL

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

Control samples should be analyzed 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 the acceptable limits.

Reference Range

Based on internal studies with plasma samples of apparently healthy persons (n=70) a mean value of 0.45 µmol/l was calculated. The standard deviation was 0.095 µmol/l.

Plasma mean value ± 2 × standard deviation: **0.45 ± 0.19 µmol/l**

Normal range: **0.26 – 0.64 µmol/l**

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-assay (n=12)

Sample	ADMA [µmol/l]	CV [%]
1	0.19	7.9
2	0.48	5.8

Inter-assay (n=6)

Sample	ADMA [µmol/l]	CV [%]
1	0.19	10.8
2	0.47	7.6

Spiking Recovery

One sample was spiked with different ADMA concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate for all concentrations was 103.8 % (n=10).

spike [$\mu\text{mol/l}$]	ADMA expected [$\mu\text{mol/l}$]	ADMA measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
0		0.365	
0.32	0.685	0.732	106.9
0.55	0.915	0.921	100.7

Dilution Recovery

One spiked plasma sample was diluted with standard 1 (zero-standard). The mean recovery was 96.7 % (n=10).

dilution	ADMA expected [$\mu\text{mol/l}$]	ADMA measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
original		1.275	
1:2	0.638	0.567	88.9
1:3	0.425	0.456	107.2
1:4	0.319	0.300	94.0

Analytical Sensitivity

The zero-standard was measured 46 times. The detection limit was set as $B_0 - 2 \text{ SD}$ and estimated to be $0.04 \mu\text{mol/l}$.

Sample	ADMA mean value [OD]	2 x Standard deviation (SD)	Detection limit [$\mu\text{mol/l}$]
zero-standard	2.2	0.14	0.04

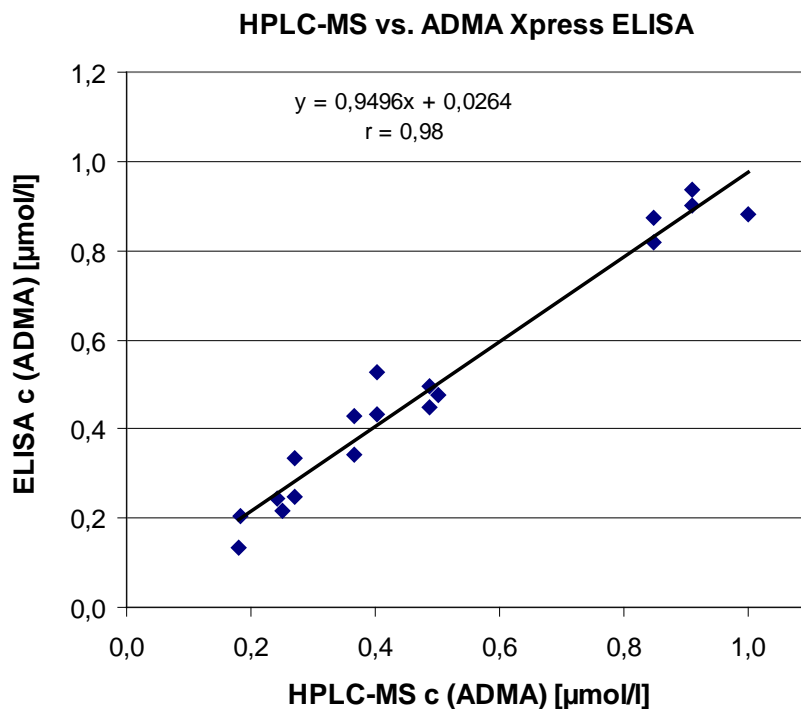
Specificity

Specificity was tested by measuring the cross-reactivity against compounds with structural similarity to ADMA. The specificity is calculated in percent in relation to the ADMA binding activity.

L-Arginine	< 0.02 %
SDMA	< 0.6 %

Correlation with HPLC-MS

13 samples were measured with this ELISA and HPLC-MS. The correlation was $r = 0.98$.



12. PRECAUTIONS

- All reagents in the package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Control samples should be analyzed with each run.
- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of sulfuric acid, which is a strong acid. Although 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. 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, as wells from already opened microtiter plates are exposed to different conditions than sealed ones.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on 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.
- 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.
- Guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the different 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

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc. Res.* 2003; **59**: 824-833
- 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.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number