

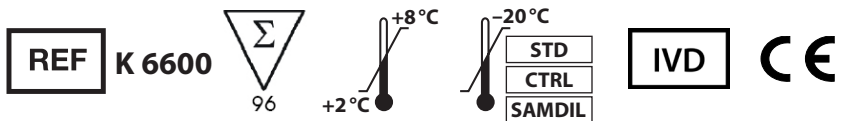
L-Citrullin

*Zur in-vitro-Bestimmung von L-Citrullin
in Urin, Serum und Plasma*

L-Citrulline

*For the in vitro determination of L-citrulline
in urine, serum and plasma*

Gültig ab / Valid from 2021-05-11



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von L-Citrullin in Urin, Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik

2. EINLEITUNG

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein intra- und interzelluläres Signalmolekül. Seine Wirkung entfaltet es unter anderem durch Reaktionen mit freien Radikalen, Metalloproteinen und spezifischen Aminosäureresten von Proteinen. Eine wichtige Rolle spielt NO bei der Regulation des Gefäßtonus. **Endotheliales NO (eNO)** wird vom Gefäßendothel produziert. Von dort diffundiert es in die benachbarten glatten Muskelzellen und bindet dort an die lösliche Isoform der Guanylatcyclase (sGC), die dadurch aktiviert wird. Die Produktion von cGMP durch die Guanylatcyclase führt schließlich zur Relaxation der glatten Muskulatur und damit zur Vasodilatation.

Kommt es durch arteriosklerotische Veränderungen zu einem Untergang des Endothels, fällt dessen vasodilatierende Wirkung weg und es resultiert eine Vasokonstriktion.

L-Citrullin als Surrogatmarker für NO

NO entsteht im Rahmen des **Citrullin-NO-Zyklus** durch die Oxidation von L-Arginin zu Citrullin. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, ist die NO-Synthase (NOS). Im weiteren Verlauf wird Citrullin innerhalb des Harnstoffzyklus wieder zu Arginin regeneriert. Da Citrullin bei der beschriebenen Reaktion parallel zu NO entsteht, ist **Citrullin ein Surrogatmarker für Stickstoffmonoxid (NO)**. Nitrosativer Stress ist daher anhand pathologisch hoher Citrullinwerte erkennbar.

Indikationen

- Bestimmung der NOS-Aktivität (NO Bildung)
- Nachweis von nitrosativem Stress verursacht durch eine gesteigerte Synthese von induzierbarem Stickstoffmonoxid (iNO)

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6600	PREC	Fällungsreagenz	1 x 20 ml
K 6600	STD	Standardkonzentrat (40 mM/l L-Citrullin)	1 x 50 µl
K 6600	STDBUF	Standardverdünnungspuffer	1 x 20 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6600	SOL A	Lösung A	1 x 10 ml
K 6600	SOL B	Lösung B	1 x 40 ml
K 6600	PLATE	Mikrotiterplatte	2 x
K 6600	SAMDIL	Probenverdünnungspuffer, lyophilisiert	4 x 2 ml
K 6600	CTRL1	Kontrolle 1, gebrauchsfertig	4 x 200 µl
K 6600	CTRL2	Kontrolle 2, gebrauchsfertig	4 x 200 µl

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
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Heizbarer Inkubator bei 90 °C
- Wasserbad bei 37 °C
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Metallrahmen für die Mikrotiterplatten-Streifen
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 540 nm

* 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 des Kits 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 bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an-zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Lyophilisierten **Probenverdünnungspuffer (SAMDIL)** mit **2 ml Reinstwas-ser** lösen, leicht mischen und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen, wieder mischen. **Probenverdünnungspuffer** (rekonstituierter SAMDIL) **ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden.**
- **Vorbereitung der Standardkurve:** Aus der L-Citrullin-Stocklösung (**STD**) eine Standardkurve nach folgendem Schema herstellen:
 - **Standard 1** (400 µM/l): L-Citrullin Stocklösung (STD, 40 mM/l) **1:100** mit Standardverdünnungspuffer (STDBUF) verdünnen. Z. B.: **10 µl** Stocklösung (40 mM/l) + **990 µl** STDBUF, gut mischen.
 - **Standard 2** (200 µM/l): Standard 1 1:2 mit STDBUF verdünnen. Z. B.: **250 µl** Standard 1 (40 mM/l) + **250 µl** STDBUF, gut mischen.
 - **Standard 3** (100 µM/l): Standard 2 1:2 mit STDBUF verdünnen
 - **Standard 4** (50 µM/l): Standard 3 1:2 mit STDBUF verdünnen
 - **Standard 5** (25 µM/l): Standard 4 1:2 mit STDBUF verdünnen
 - **Standard 6** (12,5 µM/l): Standard 5 1:2 mit STDBUF verdünnen
 - **Standard 7** (6,25 µM/l): Standard 6 1:2 mit STDBUF verdünnen
 - Als **Standard 8** wird nur Standardverdünnungspuffer verwendet.
- **Vorbereitung der Färbelösung**

Es werden **1 Teil Lösung A** (SOL A) mit **3 Teilen Lösung B** (SOL B) vermischt. **Die neue Färbelösung muss für jeden Testansatz frisch angesetzt werden, da die Lösung nur etwa 30 Minuten haltbar ist.** SOL A und SOL B sollten gekühlt (**2–8 °C**) aufbewahrt werden und vor Gebrauch auf Raumtemperatur (15–30 °C) gebracht werden.
- **L-Citrullin-Stocklösung (STD), Kontrollen (CTRL) und Probenverdün-nungspuffer (SAMDIL)** müssen bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert werden. Sie können bis zu viermal aufgetaut werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

1.	500 µl Probe in 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettieren
2.	100 µl rekonstituierten Probenverdünnungspuffer (SAMDIL) zur Probe pipettieren
3.	gut mischen
4.	1 h bei 37 °C inkubieren
5.	150 µl kaltes (2–8 °C) Fällungsreagenz (PREC) zugeben
6.	gut mischen
7.	30 min bei 2–8 °C inkubieren
8.	10 min bei 3000 <i>g</i> zentrifugieren
9.	Überstand für den Test verwenden

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Nach einer vorgeschalteten Probenvorbereitung, die störende Einflüsse durch andere Moleküle eliminiert, und Zugabe einer aus zwei Komponenten bestehenden Entwicklungslösung erfolgt ein Farbumschlag nach rot. L-Citrullin bildet hierbei mit DAMO ein intensiv rotes Produkt. Störende Nebenprodukte der Reaktion werden durch TSC reduziert.

Die Färbung ist proportional der Konzentration des Analyten. Die Messung erfolgt fotometrisch bei 540 nm. Die Konzentration der Proben wird anhand einer Standardkurve ermittelt. **Es muss ein individueller Probenleerwert, der die Eigenfärbung der Probe berücksichtigt, ermittelt und vom Probenresultat abgezogen werden.**

Pipettierschema

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

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben/Probenleerwerte im Protokollblatt.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

Es empfiehlt sich, den **Ofen** vor Beginn der Testdurchführung auf **90 °C** einzustellen und den Metallrahmen darin vorzuheizen.

Hinweis

Standards, Kontrollen und Proben sollten möglichst luftblasenfrei pipettiert werden!

1.	Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) lockern, sodass diese leicht entnommen werden können. 2 x 60 µl Standards/Kontrollen in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren (jeweils 2 Vertiefungen pro Standard/Kontrolle mit je 60 µl).
2.	4 x 60 µl der vorbereiteten Probe in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren (jeweils 4 Vertiefungen pro Probe mit je 60 µl).
3.	200 µl der Färbelösung in alle Vertiefungen der Standards/Kontrollen und in 2 der Proben-Vertiefungen pipettieren.
4.	200 µl von SOL B in die 2 verbliebenen Vertiefungen für den zu jeder Probe gehörenden individuellen Probenleerwert (ohne Färbelösung) pipettieren.
5.	Streifen der Mikrotiterplatte abkleben , entnehmen und in einen auf 90 °C vorgeheizten Metallhalter überführen.
6.	15 Minuten bei 90 °C inkubieren.
7.	Platte aus dem Ofen entfernen und die Streifen in die originale Halterung überführen.
8.	Bei Raumtemperatur etwa 10 Minuten abkühlen lassen (die Proben bleiben etwa 30 Minuten stabil).
9.	Absorption im Mikrotiterplattenphotometer bei 540 nm messen.

8. ERGEBNISSE

Die Endkonzentration von L-Citrullin in µmol/l ist die Differenz aus der Konzentration der Probe mit Färbelösung und der Konzentration des Probenleerwertes (Probe mit SOL B), multipliziert mit 1,5:

$$\text{L-Citrullin } [\mu\text{mol/l}] = ([\text{gemessener Gehalt}_{\text{Probe}}] - [\text{gemessener Gehalt}_{\text{Leerwert}}]) * 1,5$$

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 12)

Probe	Citrullin [$\mu\text{mol/l}$]	Standardabweichung (SD) [%]
1	32,9	1,3

Inter-Assay (n = 7)

Probe	Citrullin [$\mu\text{mol/l}$]	Standardabweichung (SD) [%]
1	54,7	3,0
2	48,9	3,7

Wiederfindung in der Verdünnung

Die Linearität des Tests wurde durch Verdünnen einer Patientenprobe bestimmt.

Verdünnung	Messwert [$\mu\text{mol/l}$]	Erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
original	100	100	100,0
1:1,2	87,4	83,3	104,9
1:1,5	71,2	66,6	106,9
1:3,0	37,2	33,3	111,7

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null.

Probe	Citrullin Mittelwert [OD]	2 Standard- abweichungen (2 x SD)[%]	Nachweisgrenze [$\mu\text{mol/l}$]
Standard Null	1,1	0,2	1,5

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Lösung B (SOL B) enthält eine starke Säure und muss vorsichtig verwendet werden. Sie kann bei Kontakt mit der Haut Verätzungen verursachen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen 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.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

- 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 Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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

1. Knipp, M, and M Vasák. 2000. "A Colorimetric 96-Well Microtiter Plate Assay for the Determination of Enzymatically Formed Citrulline." *Analytical Biochemistry* **286** (2) (November 15): 257–64. doi:10.1006/abio.2000.4805.
2. Kuklinski, B. 2005. "Zur Praxisrelevanz von Nitrosativem Stress." *Umwelt-Medizin-Gesellschaft* **18** (2): 89–172.
3. Wanchu, A, M Khullar, K Sud, V Sakhuja, K Thennarasu, A Sud, and P Bambery. 2001. "Serum and Urine Nitrite and Citrulline Levels among Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Possible Addition to Activity Parameters?" *Journal of Clinical Rheumatology: Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases* **7** (1) (February): 10–5; discussion 15.

4. Yu, Jin-Ju, and Suk-Heung Oh. 2010. "Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Strains with Ornithine Producing Capacity from Natural Sea Salt." *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* **48** (4) (August): 467–72. doi:10.1007/s12275-010-0204-9.

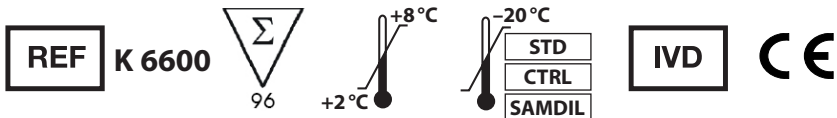
Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

L-Citrulline

*For the in vitro determination of L-citrulline in urine, serum
and plasma*

Valid from 2021-05-11



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	13
2. INTRODUCTION	13
3. MATERIAL SUPPLIED	13
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	14
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	14
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	15
7. ASSAY PROCEDURE	16
<i>Principle of the test</i>	16
<i>Test procedure</i>	16
8. RESULTS	17
9. LIMITATIONS	17
10. QUALITY CONTROL	17
<i>Reference range</i>	18
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	18
<i>Precision and reproducibility</i>	18
<i>Dilution recovery</i>	18
<i>Analytical sensitivity</i>	18
12. PRECAUTIONS	19
13. TECHNICAL HINTS	19
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	19
15. REFERENCES	20

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is intended for the quantitative determination of L-citrulline in urine, serum and plasma. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is an intra- and intercellular signaling molecule. It reacts with free radicals, metalloproteins and specific amino acid residues of proteins. NO plays an important role in the regulation of vascular tone. **Endothelial NO (eNO)** is produced by the vascular endothelium. It diffuses to neighbouring vascular smooth muscle cells (VSMC), where NO activates soluble guanylate cyclase (sGC), which subsequently increases the intracellular cGMP production from GTP, and which in turn causes relaxation of smooth muscle and vasodilatation.

Thus, functional changes of the endothelium in coronary artery disease may be an important factor in the development of vasospasm, ischaemia and thrombosis.

L-citrulline as surrogate marker for NO

NO is synthesised in the **citrulline-NO-cycle** when L-arginine is oxidised to citrulline by NO synthase (NOS). In the second part of the urea cycle, arginine is re-synthesised from citrulline. The NOS catalysed formation of L-citrulline and NO proceeds in two steps, whereby the product stoichiometry of L-citrulline and NO is 1:1. Thus, the conversion of L-arginine to **L-citrulline can be used as a surrogate marker for the NO synthesis.**

Pathologic high levels of citrulline serve as an indicator of nitrosative stress.

Indications

- Estimation of NOS activity (NO production)
- Detection of nitrosative stress due to an enhanced synthesis of inducible nitric oxide (iNO)

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6600	PREC	Precipitation reagent	1 x 20 ml
K 6600	STD	Standard concentrate (40 mM/l L-citrulline)	1 x 50 µl
K 6600	STDBUF	Standard dilution buffer	1 x 20 ml
K 6600	SOL A	Solution A	1 x 10 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6600	SOL B	Solution B	1 x 40 ml
K 6600	PLATE	Microtiter plate	2 x
K 6600	SAMDIL	Sample dilution buffer, lyophilised	4 x 2 ml
K 6600	CTRL1	Control 1, ready-to-use	4 x 200 µl
K 6600	CTRL2	Control 2, ready-to-use	4 x 200 µl

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Heated incubator at 90 °C
- Water bath at 37 °C
- Metal frame for the microtiter plate strips
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 540 nm

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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 the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 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.
- Reconstitute lyophilised **sample dilution buffer (SAMDIL)** with **2 ml of ultrapure water**, mix gently, allow the vial content to dissolve for 5 minutes at room temperature and mix again. **Sample dilution buffer** (reconstituted SAMDIL) **is not stable and cannot be stored.**

- **Standard curve preparation**

Prepare from the L-citrulline **stock solution (STD)** a standard curve according to the following scheme:

- **Standard 1** (400 µM/l): dilute L-citrulline stock solution (STD, 40 mM/l) **1:100** with standard dilution buffer (STDBUF), e.g. **10 µl** stock solution (40 mM/l) + **990 µl** STDBUF, mix well.
- **Standard 2** (200 µM/l): Standard 1 1:2 diluted with STDBUF, e.g. **250 µl** standard 1 (40 mM/l) + **250 µl** STDBUF, mix well.
- **Standard 3** (100 µM/l): Standard 2 1:2 diluted with STDBUF
- **Standard 4** (50 µM/l): Standard 3 1:2 diluted with STDBUF
- **Standard 5** (25 µM/l): Standard 4 1:2 diluted with STDBUF
- **Standard 6** (12.5 µM/l): Standard 5 1:2 diluted with STDBUF
- **Standard 7** (6.25 µM/l): Standard 6 1:2 diluted with STDBUF
- For **standard 8** standard dilution buffer is used.
- **Preparation of the colour solution**

Mix **1 part solution A (SOL A)** with **3 parts solution B (SOL B)**. Prepare fresh colour solution for each assay, because it is stable only for around 30 minutes. Store SOL A and SOL B at 2–8 °C and bring it to room temperature before use.

- **L-Citrulline stock solution (STD), controls (CTRL) and sample dilution buffer (SAMDIL)** should be stored at **-20 °C** before use. They can be freeze-thawed up to four times.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

1.	Pipet 500 µl of sample in 1.5 ml reaction vial
2.	Add 100 µl of reconstituted sample dilution buffer (SAMDIL) to the sample
3.	Mix well
4.	Incubate for 1 h at 37 °C
5.	Add 150 µl of cold (2–8 °C) precipitation reagent (PREC)

6.	Mix well
7.	Incubate for 30 min at 2–8 °C
8.	Centrifuge at 3.000 g for 10 min
9.	Use the supernatant in the test

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

After a sample pre-treating to eliminate the interference of other substances, a development solution composed of two components is added to the sample. The colour changes to intensive red due to the reaction of L-citrulline with DAMO. The interference of reaction byproducts is reduced by TSC-treating.

The colour intensity is proportional to the analyte concentration. The absorbance is measured at 540 nm. The concentration of the samples is estimated using a standard curve. **In order to eliminate the effect of the sample matrix on the absorption, an individual sample blank should be run. The obtained blank value is subtracted from the sample result.**

Test procedure

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

Mark the positions of standards/controls/samples/blank for sample on a protocol sheet.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

It is recommended to switch on the oven at 90 °C and place the metal frame for the microtiter plate modules in it before the start of the test procedure.

Note

Standards, controls and samples should be pipetted without air bubbles.

1.	Loosen the strips of the microtiter plate (PLATE), so that they can be easily taken out. Pipet 2 x 60 µl standards/controls into the into the respective wells (2 wells per standard/control; 60 µl into each).
2.	Pipette 4 x 60 µl of the prepared sample into the respective wells (4 wells per sample; 60 µl into each).

3.	Add 200 µl of colour solution into each well for standards/controls and into 2 of the sample wells .
4.	Add 200 µl of SOL B into the 2 remaining wells for the individual sample blank (these without colour solution).
5.	Cover microtiter plate strips, take them out and bring them in a metal holder pre-heated to 90 °C .
6.	Incubate at 90 °C for 15 minutes .
7.	Take the microtiter plate strips out of the heater and place them in the original holder.
8.	Let the strips cool down to room temperature for 10 minutes (the samples are stable for ~ 30 minutes).
9.	Read absorption with an microtiter plate reader at 540 nm .

8. RESULTS

The final L-citrulline concentration in µmol/l is calculated as a difference between the sample concentration with the colour solution and the concentration of the sample blank (sample with SOL B) multiplied by 1.5.

$$\text{L-citrulline } [\mu\text{mol/l}] = ([\text{measured content}_{\text{sample}}] - [\text{measured content}_{\text{blank}}]) * 1.5$$

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG 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 sample are outside the acceptable limits.

Reference range

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 12)

Sample	Citrullin [$\mu\text{mol/l}$]	Standard deviation (SD) [%]
1	32.9	1.3

Inter-Assay (n = 7)

Sample	Citrullin [$\mu\text{mol/l}$]	Standard deviation (SD) [%]
1	54.7	3.0
2	48.9	3.7

Dilution recovery

Linearity of the test was determined by diluting a patient sample.

Dilution	Measured [$\mu\text{mol/l}$]	Expected [$\mu\text{mol/l}$]	Recovery [%]
original	100	100	100.0
1:1.2	87.4	83.3	104.9
1:1.5	71.2	66.6	106.9
1:3.0	37.2	33.3	111.7

Analytical sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$.

Sample	Citrullin mean value [OD]	2 standard deviations (2 x SD)[%]	Detection limit [$\mu\text{mol/l}$]
Zero-standard	1.1	0.2	1.5

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Solution B (SOL B) contains a strong acid and must be handled with care. It can cause acid 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.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- 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 send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Knipp, M, and M Vasák. 2000. "A Colorimetric 96-Well Microtiter Plate Assay for the Determination of Enzymatically Formed Citrulline." *Analytical Biochemistry* **286** (2) (November 15): 257–64. doi:10.1006/abio.2000.4805.
2. Kuklinski, B. 2005. "Zur Praxisrelevanz von Nitrosativem Stress." *Umwelt-Medizin-Gesellschaft* **18** (2): 89–172.
3. Wanchu, A, M Khullar, K Sud, V Sakhuja, K Thennarasu, A Sud, and P Bambery. 2001. "Serum and Urine Nitrite and Citrulline Levels among Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Possible Addition to Activity Parameters?" *Journal of Clinical Rheumatology : Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases* **7** (1) (February): 10–5; discussion 15.
4. Yu, Jin-Ju, and Suk-Heung Oh. 2010. "Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Strains with Ornithine Producing Capacity from Natural Sea Salt." *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* **48** (4) (August): 467–72. doi:10.1007/s12275-010-0204-9.

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
	Consult specification data sheet		