

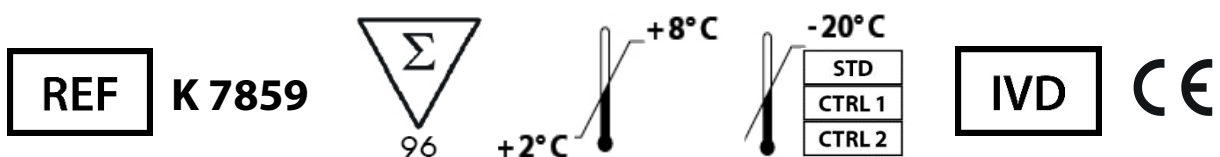
# Homoarginin ELISA

*Zur in-vitro Bestimmung von L-Homoarginin in Serum und EDTA-Plasma*

# Homoarginine ELISA

*For the in vitro determination of L-homoarginine in serum and EDTA plasma*

Gültig ab / Valid from 2022-03-01



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

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>3</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>5</b>
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema Derivatisierung</i>	6
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	6
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>8</b>
<i>Biotininterferenz</i>	9
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>9</b>
<i>Referenzwerte</i>	9
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	10
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	11
<i>Linearität</i>	12
<i>Analytische Sensitivität</i>	13
<i>Analytische Spezifität</i>	13
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>13</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>14</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>15</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>15</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der Homoarginin-Assay K 7859 ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) für professionelle Laboranwender zur quantitativen Bestimmung der Konzentration von freiem L-Homoarginin in Serum und EDTA-Plasma von Patienten jeden Alters und Geschlechts.

Der Assay ist ein medizinisches In-vitro-Diagnostikum, das manuell oder mit einer automatisierten Plattform verwendet werden kann.

Der Nachweis einer verminderten Homoarginin-Konzentration im Blutkreislauf dient als diagnostisches Hilfsmittel, um den behandelnden Therapeuten über die Notwendigkeit der Verschreibung geeigneter diätetischer Maßnahmen zur Erhöhung der Homoarginin-Konzentration im Blutkreislauf zu informieren.

## 2. EINLEITUNG

L-Homoarginin ist eine körpereigene, nicht-proteinogene Aminosäure, die sich von Arginin durch eine zusätzliche Methylgruppe in der Kohlenstoff-Seitenkette unterscheidet.<sup>[1]</sup> Homoarginin kann beim Menschen aus Lysin hergestellt werden, wobei die Niere der Hauptproduktionsort für Homoarginin ist.

In den letzten Jahren wurden in mehreren epidemiologischen Studien niedrige Homoargininwerte als unabhängiger Risikomarker für kardiovaskuläre (Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit), zerebrovaskuläre (Schlaganfall) und Nierenerkrankungen sowie für die Sterblichkeit identifiziert.<sup>[2-9]</sup> Diese Ergebnisse sind von besonderer Bedeutung, da niedrige Homoargininwerte ein unabhängiger Prädiktor für diese Ergebnisse waren, obwohl sie um etablierte Risikofaktoren bereinigt wurden.<sup>[2-9]</sup>

Dies könnte darauf hindeuten, dass die Homoargininkonzentration im Serum auf bisher unerkannte pathophysiologische Prozesse hinweist, die über die derzeit etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren hinausgehen. Tatsächlich haben Studien, die mehr als 10 verschiedene Studienkohorten mit mehr als 10 000 Personen umfassten, gezeigt, dass die Ergänzung der etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren durch Homoarginin die Mortalitätsvorhersage signifikant verbessern kann.<sup>[2; 5]</sup>

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7859	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 wells
K 7859	STD	Standard (0; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0 $\mu$ M)	6 x 500 $\mu$ l
K 7859	CTRL 1	Kontrolle (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 $\mu$ l
K 7859	CTRL 2	Kontrolle (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 $\mu$ l
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7859	DERBUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	2 x 80 ml
K 7859	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 12 ml
K 7859	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	1 vial
K 0008.07	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 7 ml
K 7859	ASYREAG	Assayreagenz, lyophilisiert	1 vial
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

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

## 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehaltes im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das bei **2-8 °C** gelagerte **WASHBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2-8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **Standards und Kontrollen (STD/CTRL)** werden bei **-20°C** gelagert. Sie sind so bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Nach Gebrauch wieder einfrieren. STD und CTRL werden, wie die Proben, vor der Derivatisierung verdünnt (siehe Pipettierschema Derivatisierung).
- **DMSO** kristallisiert bei 2-8 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO auf Raumtemperatur bringen, um die Kristalle zu lösen.
- Das **lyophilisierte Derivatisierungsreagenz (DER)** ist, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor dem Öffnen auf Raumtemperatur bringen. Zum Rekonstituieren **6 ml DMSO** zugeben und mit dem Vortex-Mixer mehrere Sekunden mischen, 15 min stehen lassen und zwischendurch vortexen. Das **Derivatisierungsreagenz** (gelöstes DER) ist **2 Monate bei 2-8 °C** haltbar. Vor dem erneuten Gebrauch wieder auf Raumtemperatur bringen. Bitte beachten: DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Das **lyophilisierte Assayreagenz (ASYREAG)** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Das ASYREAG wird mit **6 ml Waschpuffer** rekonstituiert. **Assayreagenz** (rekonstituiertes ASYREAG) **kann bei -20°C gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### Serum und EDTA-Plasma

Frisch abgenommene Proben können bis zu 3 Tage bei 2-8 °C oder bei Raumtemperatur (15-30 °C) gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern.

Die Proben werden vor dem Einsatz im Test verdünnt (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

Zur weiteren Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Derivatisierungsreagenz versetzt (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

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

Zur Vorbereitung werden die verdünnten Standards, Kontrollen und Proben mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen L-Homoarginin versetzt.

Anschließend werden die derivatisierte Proben zusammen mit dem Assayreagenz, welches L-Homoarginin-Derivat (Tracer) enthält, in einer ELISA-Platte inkubiert, die mit einem polyklonalen Antikörper gegen L-Homoarginin-Derivat beschichtet ist. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem Tracer um die Bindung an die polyklonalen Antikörper.

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, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. 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 L-Homoarginin in der Probe reduziert sich die Konzentration des an den Antikörper gebundenen Tracers und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### *Pipettierschema Derivatisierung*

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

Standards (STD), Kontrollen (CTRL) und Proben werden **1:8** mit Reaktionspuffer wie folgt verdünnt:

**50 µl STD/ CTRL/ Probe + 350 µl Reaktionspuffer (DERBUF)**, gut mischen.

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

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

1.	Jeweils <b>50 µl</b> der <b>verdünnten Standards/Kontrollen/Proben</b> in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
2.	<b>750 µl Reaktionspuffer</b> (DERBUF) in alle Reaktionsgefäße pipettieren.
3.	<b>50 µl Derivatisierungsreagenz</b> in alle Reaktionsgefäße pipettieren und <b>gründlich mischen</b> durch mehrmaliges Umdrehen oder mehrere Sekunden Vortexen.
4.	<b>45 min</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) auf einem <b>Horizontalschüttler</b> inkubieren.

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

### *Pipettierschema Testdurchführung*

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

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



1.	<b>2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben</b> als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren
2.	<b>50 µl Assayreagenz</b> (ASYREAG) in jede Vertiefung pipettieren.
3.	Streifen luftdicht abdecken und <b>2 Stunden</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter <b>Schütteln</b> inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	<b>100 µl Konjugat</b> (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und <b>30 Minuten</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter <b>Schütteln</b> inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	<b>10-15 min*</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) im <b>Dunkeln</b> inkubieren.
10.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Auf folgende Punkte ist zu achten:

Eine Derivatisierung der Proben ist sowohl in 45 Minuten auf einem Horizontal-schüttler als auch, nach sorgfältigem Durchmischen, in 90 Minuten ohne Schütteln in einem Automaten möglich. Bei automatisierter Abarbeitung dürfen unter Wahrung der jeweiligen Verdünnungen die Volumina von Proben und Verdünnern

skaliert werden. Gerätespezifische Minimal- und Maximalvolumina sind zu beachten. Die Homogenität der resultierenden Verdünnung ist zu gewährleisten.

Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

## 8. ERGEBNISSE

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

### 1. 4-Parameter-Funktion

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

### 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

### 3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

### Serum und EDTA-Plasma

Es wird **kein Faktor** benötigt, da Standards und Proben auf die gleiche Weise verdünnt und behandelt werden.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs können mit Reaktionspuffer stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diesen Verdünnungsfaktor bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*höchste Konzentration der Standardkurve x anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*LoB x anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

### *Biotininterferenz*

Proben, die Biotin in einer Konzentration von  $\leq 12000$  ng/ml enthalten, zeigen eine Veränderung der Ergebnisse von  $< 25$  %. Höhere Biotinkonzentrationen können zu falschen Ergebnissen führen. Bei Patienten, die  $> 5$  mg/Tag Biotin einnehmen, sollte die Probeentnahme frühestens 24 Stunden nach der letzten Applikation erfolgen. Ergebnisse für Patienten, die Biotinpräparate einnehmen oder eine hochdosierte Biotintherapie erhalten, sollten grundsätzlich vorsichtig und im Zusammenhang mit dem gesamten klinischen Bild interpretiert werden.

## **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*

Anhand einer laborinternen Studie mit Serum- und EDTA-Plasmaproben von augenscheinlich gesunden Personen (50 Frauen und 50 Männer) wurde ein Median von  $2,0 \mu\text{mol/l}$  (Frauen) bzw.  $2,1 \mu\text{mol/l}$  (Männer) ermittelt. Bei Betrachtung der 2,5. Perzentile dieses Kollektivs ergibt sich folgender Normbereich:

Frauen:  $> 1,1 \mu\text{mol/l}$

Männer:  $> 1,2 \mu\text{mol/l}$

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Genauigkeit – Präzision*

#### **Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 16**

Die Wiederholbarkeit wurde mit 8 Proben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ $\mu\text{mol/l}$ ]	VK [%]
EDTA-Plasma 1	1,97	5,8
2	3,20	4,0
3	3,08	5,1
4	1,71	6,7
Serum 1	2,32	5,5
2	3,59	8,0
3	3,44	9,9
4	1,92	8,3

#### **Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 12**

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 14 Proben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ $\mu\text{mol/l}$ ]	VK [%]
EDTA-Plasma 1	0,61	11,2
2	1,03	9,2
3	1,61	6,0
4	1,94	7,8
5	3,32	11,8
6	3,27	4,8
7	4,78	6,1
Serum 1	0,71	11,2
2	1,11	11,7
3	1,60	12,4
4	1,80	7,7
5	2,16	9,2
6	3,55	13,6
7	4,41	8,6

## Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 3 EDTA-Plasma- und 3 Serumproben wurden dafür mit bekannten L-Homoarginin-Konzentrationen versetzt und gemessen.

### EDTA-Plasma

Probe [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{mol/l}$ ]	erwartet [ $\mu\text{mol/l}$ ]	gemessen [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Wiederfindung [%]
0,52	0,5	1,02	0,89	87,4
	1	1,52	1,36	89,2
	1,5	2,02	2,13	105,2
	2	2,52	2,74	108,7
1,82	0,5	2,32	2,27	97,8
	1	2,82	2,84	100,9
	1,5	3,32	3,56	107,4
	2	3,82	3,89	101,9
3,22	0,5	3,72	3,49	93,7
	1	4,22	4,22	100,1
	1,5	4,72	4,59	97,2
	2	5,22	5,36	102,7

### Serum

Probe [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{mol/l}$ ]	erwartet [ $\mu\text{mol/l}$ ]	gemessen [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Wiederfindung [%]
0,70	0,5	1,20	0,97	81,1
	1	1,70	1,40	82,7
	1,5	2,20	2,19	99,5
	2	2,70	2,73	101,1
1,98	0,5	2,49	2,48	99,4
	1	2,99	2,81	93,9
	1,5	3,49	3,60	103,0
	2	3,99	4,21	105,4
2,99	0,5	3,49	3,15	90,3
	1	3,99	3,87	97,0
	1,5	4,49	4,69	104,5
	2	4,99	5,07	101,5

## Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung von 3 EDTA-Plasma- und 3 Serumproben nachgewiesen.

Für L-Homoarginin in EDTA-Plasma und Serum wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 0,31 – 3,79  $\mu\text{mol/l}$  nachgewiesen bei einer Wiederfindung von 80,1 – 118,0 % in diesem Bereich.

### EDTA-Plasma

Probe [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Verdünnung	erwartet [ $\mu\text{mol/l}$ ]	gemessen [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Wiederfindung [%]
1,57	1:2	0,79	0,85	108,5
	1:3	0,52	0,59	111,7
	1:4	0,39	0,42	107,0
	1:5	0,31	0,31	99,1
	1:6	0,26	0,29	109,0
	1:8	0,20	0,20	100,1
2,76	1:2	1,38	1,24	90,2
	1:3	0,92	0,75	81,3
	1:4	0,69	0,61	88,1
	1:5	0,55	0,46	82,7
	1:6	0,46	0,40	87,1
	1:8	0,34	0,32	94,0
3,79	1:2	1,89	1,87	98,8
	1:3	1,26	1,21	95,5
	1:4	0,95	0,81	85,4
	1:5	0,76	0,65	85,5
	1:6	0,63	0,51	80,1
	1:8	0,47	0,40	84,1

### Serum

Probe [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Verdünnung	erwartet [ $\mu\text{mol/l}$ ]	gemessen [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Wiederfindung [%]
1,90	1:2	0,95	0,85	88,9
	1:3	0,63	0,58	91,9
	1:4	0,48	0,47	98,5
	1:5	0,38	0,40	106,1
	1:6	0,32	0,36	114,1

2,68	1:2	1,34	1,30	97,0
	1:3	0,89	0,88	99,0
	1:4	0,67	0,65	97,1
	1:5	0,54	0,56	103,7
	1:6	0,45	0,45	101,3
	1:8	0,33	0,40	118,0
3,67	1:2	1,83	2,01	109,7
	1:3	1,22	1,27	104,1
	1:4	0,92	0,87	94,3
	1:5	0,73	0,68	93,1
	1:6	0,61	0,59	97,0
	1:8	0,46	0,47	103,4
	1:12	0,31	0,34	111,9

### Analytische Sensitivität

Leerwert ( <i>limit of blank</i> , LoB)	0,18 µmol/l
Nachweisgrenze ( <i>limit of detection</i> , LoD)	0,23 µmol/l
Bestimmungsgrenze ( <i>limit of quantitation</i> , LoQ)	0,35 µmol/l

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

### Analytische Spezifität

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

ADMA	keine Kreuzreaktivität nachgewiesen
SDMA	keine Kreuzreaktivität nachgewiesen
L-Arginin	< 0,071 %

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.

- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können. **Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

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



## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST











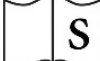

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen 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

1. Meinitzer A, Drechsler C, Tomaschitz A, Pilz S, Krane V, Wanner C, März W (2011) Homoarginine: a new cardiovascular risk marker in hemodialysis patients. *Laboratoriums-Medizin* 35:153-9
2. März W, Meinitzer A, Drechsler C, Pilz S, Krane V, Kleber ME, Fischer J, Winkelmann BR, Böhm BO, Ritz E, Wanner C (2010) Homoarginine, cardiovascular risk, and mortality. *Circulation* 122:967-975
3. Atzler D, Gore MO, Ayers CR, Choe CU, Böger RH, de Lemos JA, McGuire DK, Schwedhelm E (2014) Homoarginine and cardiovascular outcome in the population-based Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:2501-2507
4. Choe CU, Atzler D, Wild PS, Carter AM, Böger RH, Ojeda F, Simova O, Stockebrand M, Lackner K, Nabuurs C, Marescau B, Streichert T, Müller C, Lüneburg N, De Deyn PP, Benndorf RA, Baldus S, Gerloff C, Blankenberg S, Heerschap A, Grant PJ, Magnus T, Zeller T, Isbrandt D, Schwedhelm E (2013) Homoarginine levels are regulated by L-arginine:glycineamidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation* 128:1451-61
5. Atzler D, Rosenberg M, Anderssohn M, Choe CU, Lutz M, Zugck C, Böger RH, Frey N, Schwedhelm E (2013) Homoarginine – an independent marker of mortality in heart failure. *Int J Cardiol* 168:4907-9

6. Drechsler C, Meinitzer A, Pilz S, Krane V, Tomaschitz A, Ritz E, März W, Wanner C (2011) Homoarginine, heart failure, and sudden cardiac death in haemodialysis patients. *Eur J Heart Fail* 13:852-9
7. Drechsler C, Kollerits B, Meinitzer A, März W, Ritz E, König P, Neyer U, Pilz S, Wanner C, Kronenberg F, MMKD Study Group (2013) Homoarginine and progression of chronic kidney disease: results from the mild to moderate kidney disease study. *Plos One* 8:e63560
8. Cullen ME, Yuen AH, Felkin LE, Smolenski RT, Hall JL, Grindle S, Miller LW, Birks EJ, Yacoub MH, Barton PJ (2006) Myocardial expression of the arginine:glycineamidinotransferase gene is elevated in heart failure and normalized after recovery: potential implications for local creatine synthesis. *Circulation* 114(1 Suppl):I16-20
9. Kleber ME, Seppälä I, Pilz S, Hoffmann MM, Tomaschitz A, Oksala N, Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Mäkelä KM, Laaksonen R, Kähönen M, Raitakari OT, Huang J, Kienreich K, Fahrleitner-Pammer A, Drechsler C, Krane V, Boehm BO, Koenig W, Wanner C, Lehtimäki T, März W, Meinitzer A (2013). Genome-wide association study identifies 3 genomic loci significantly associated with serum levels of homoarginine: the AtheroRemo Consortium. *Circ Cardiovasc Genet* 6:505-13

### Verwendete Symbole:

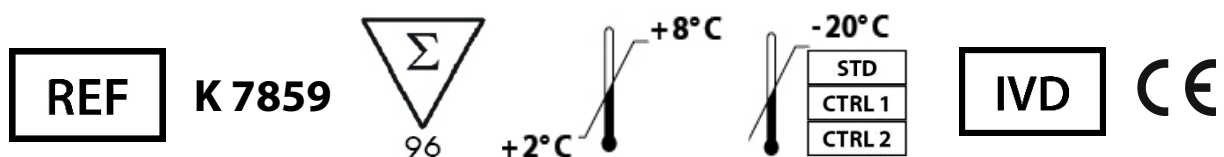
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

Manual

# Homoarginine ELISA

*For the in vitro determination of L-homoarginine in serum and EDTA plasma*

Valid from 2022-03-01



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

Tel: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>19</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>21</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>21</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>22</b>
<i>Principle of the test</i>	22
<i>Derivatisation procedure</i>	22
<i>Test procedure</i>	23
<b>8. RESULTS</b>	<b>24</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>25</b>
<i>Biotin interference</i>	25
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>25</b>
<i>Reference Range</i>	26
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>26</b>
<i>Accuracy – Precision</i>	26
<i>Accuracy – Trueness</i>	27
<i>Linearity</i>	28
<i>Analytical sensitivity</i>	29
<i>Analytical specificity</i>	30
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>30</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>30</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>31</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>31</b>

## 1. INTENDED USE

The homoarginine assay K 7859 is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) intended for professional laboratory users for the quantitative detection of the free L-homoarginine concentration in serum and EDTA-plasma from patients of any age and gender.

The assay is an in vitro diagnostic medical device, which can be used manually or by an automated platform.

The detection of a low homoarginine concentration in the circulation of a patient is used as a diagnostic aid to inform the treating therapist about the necessity to prescribe appropriate dietetic interventions that increase the homoarginine level in the circulation.

## 2. INTRODUCTION

L-homoarginine is an endogenous, nonproteinogenic amino acid which differs from arginine by an additional methyl group in the carbon side chain.<sup>[1]</sup> Homoarginine can be produced from lysine in humans, with the kidney being the major production site for homoarginine.

Over the last few years, several epidemiological studies have identified low homoarginine levels as an independent risk marker for cardiovascular (heart failure, coronary artery disease), cerebrovascular (stroke) and renal diseases as well as for mortality.<sup>[2-9]</sup> These findings are of particular importance because low homoarginine was an independent predictor for these outcomes despite adjustments for established risk factors.<sup>[2-9]</sup>

This may suggest that serum homoarginine concentrations indicate previously unrecognized pathophysiological processes beyond those reflected by currently established cardiovascular risk factors. Indeed, studies including >10 different study cohorts comprising >10,000 individuals showed that addition of homoarginine to established cardiovascular risk factors could significantly improve mortality prediction.<sup>[2; 5]</sup>

### 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 7859	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 7859	STD	Standards (0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 µM)	6 x 500 µl
K 7859	CTRL 1	Control (see specification for range)	1 x 500 µl
K 7859	CTRL 2	Control (see specification for range)	1 x 500 µl
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 7859	DERBUF	Reaction buffer, ready-to-use	2 x 80 ml
K 7859	CONJ	Conjugate, ready-to-use	1 x 12 ml
K 7859	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	1 vial
K 0008.07	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 7 ml
K 7859	ASYREAG	Assay reagent, lyophilised	1 vial
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

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

### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

\* 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. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2-8 °C for 1 month**.
- Store the **standards and controls (STD/CTRL)** frozen at **-20 °C**. They are stable at -20 °C until the expiry date stated on the label. Thaw at room temperature before use and mix well. Re-freeze STD and CTRL after use. STD and CTRL are diluted like the samples before derivatisation (see derivatisation procedure).
- **DMSO** crystallises at 2-8 °C. Before use, bring to room temperature to dissolve the crystals.
- The **lyophilised derivatisation reagent (DER)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. Bring to room temperature before opening and reconstitute the content with **6 ml DMSO**. Mix thoroughly with a vortex-mixer and allow to dissolve for 15 minutes. The **derivatisation reagent** (reconstituted DER) can be stored at **2-8 °C for 2 months**. Bring to room temperature before reuse. **Please note:** DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- The **lyophilised assay reagent (ASYREAG)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. Reconstitute the ASYREAG with **6 ml of wash buffer**. **Assay reagent** (reconstituted ASYREAG) **can be stored at -20°C**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### Serum and EDTA plasma

Freshly collected samples can be stored for 3 days at room temperature or at 2-8 °C. For longer storage keep frozen at -20 °C.

Dilute samples before use (see derivatisation procedure).

For sample preparation a derivatisation reagent is added (see derivatisation procedure).

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

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

The sample preparation includes the addition of a derivatisation reagent for the derivatisation of L-homoarginine.

Afterwards, the treated samples are incubated in the wells of a microtiter plate coated with a polyclonal antibody against L-homoarginine derivative, together with an assay reagent containing L-homoarginine derivative (tracer). During the incubation period, the target in the sample competes with the tracer for the binding of the polyclonal antibodies on the wall of the microtiter wells.

During the second incubation step, a peroxidase conjugate is added 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 colour changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour is inverse proportional to the L-homoarginine concentration in the sample; this means, high L-homoarginine concentration in the sample reduces the concentration of antibody-bound tracer and lowers the photometric signal. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standards. L-homoarginine, present in the samples, is determined directly from this curve.

### *Derivatisation procedure*

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

Dilute standards (STD), controls (CTRL) and samples **1:8** with reaction buffer as follows:

**50 µl STD/ CTRL/ sample + 350 µl reaction buffer (DERBUF)**, mix well.

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

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



1.	Add <b>50 µl</b> of the <b>diluted standards/controls/samples</b> into vials.
2.	Add <b>750 µl reaction buffer</b> (DERBUF) into each vial.
3.	Add <b>50 µl derivatisation reagent</b> into each vial and <b>mix thoroughly</b> by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer.
4.	Incubate for <b>45 min</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .

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

### *Test procedure*

Mark the positions of standards/controls/samples in duplicate on a protocol sheet. Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips covered with foil at 2-8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

5.	For the analysis in duplicate take <b>2 x 50 µl</b> of the <b>derivatised standards/controls/samples</b> out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.
6.	Add <b>50 µl assay reagent</b> (ASYREAG) into each well of the microtiter plate.
7.	Cover the strips tightly and incubate for <b>2 hours at</b> room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .
8.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
9.	Add <b>100 µl conjugate</b> (CONJ) into each well.
10.	Cover the strips and incubate for <b>30 minutes</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .
11.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
12.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.

13.	Incubate for <b>10-15 min*</b> at room temperature (15-30 °C) in the <b>dark</b> .
14.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.
15.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> against 620 nm (690 nm) as a reference.

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

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. Attention should be paid to the following points:

Derivatisation of the samples is possible in 45 minutes on a horizontal shaker or, after thorough mixing, in 90 minutes without shaking in an automated processor. In automated processing, the volumes of samples and diluents may be scaled while maintaining the respective dilutions. Device-specific minimum and maximum volumes must be taken into account. The homogeneity of the resulting dilution must be ensured.

For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

## 8. RESULTS

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

### 1. 4 parameter algorithm

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

### 2. Point-to-point calculation

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

### 3. Spline algorithm

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the program used, the duplicate values should be evaluated manually.

### **Serum and EDTA plasma**

**No factor** is required as standards and samples are diluted and treated in the same way.

## **9. LIMITATIONS**

Samples with concentrations above the measurement range can be further diluted with reaction buffer and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

*highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used*

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

*LoB × sample dilution factor to be used*

LoB see chapter "Performance Characteristics".

### *Biotin interference*

Samples containing a biotin concentration of  $\leq 12000$  ng/ml show a change of the results of  $< 25$  %. Higher concentrations of biotin can lead to false results. Patients taking  $> 5$  mg biotin per day should wait at least 24 hours after taking biotin to have their samples collected. Results of patients taking biotin supplements or receiving a high-dose biotin therapy should generally be interpreted along with the total clinical picture.

## **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 samples are outside of the acceptable limits.

### *Reference Range*

Based on in-house studies with serum and EDTA samples from apparently healthy persons (50 women and 50 men), a median of 2.0  $\mu\text{mol/l}$  (women) and 2.1  $\mu\text{mol/l}$  (men) was determined. Considering the 2.5<sup>th</sup> percentile of this collective, the following normal range was determined:

Women: > 1.1  $\mu\text{mol/l}$

Men: > 1.2  $\mu\text{mol/l}$

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## **11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 16**

The repeatability was assessed with 8 samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

<b>Sample</b>	<b>Mean value [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	<b>CV [%]</b>
EDTA plasma 1	1.97	5.8
2	3.20	4.0
3	3.08	5.1
4	1.71	6.7
serum 1	2.32	5.5
2	3.59	8.0
3	3.44	9.9
4	1.92	8.3

#### **Reproducibility (Inter-Assay); n = 12**

The reproducibility was assessed with 14 samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [ $\mu\text{mol/l}$ ]	CV [%]
EDTA plasma 1	0.61	11.2
2	1.03	9.2
3	1.61	6.0
4	1.94	7.8
5	3.32	11.8
6	3.27	4.8
7	4.78	6.1
serum 1	0.71	11.2
2	1.11	11.7
3	1.60	12.4
4	1.80	7.7
5	2.16	9.2
6	3.55	13.6
7	4.41	8.6

### Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, L-homoarginine spikes with known concentrations were added to 3 EDTA plasma and 3 serum samples.

#### EDTA plasma

Sample [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Expected [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Obtained [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Recovery [%]
0.52	0.5	1.02	0.89	87.4
	1	1.52	1.36	89.2
	1.5	2.02	2.13	105.2
	2	2.52	2.74	108.7
1.82	0.5	2.32	2.27	97.8
	1	2.82	2.84	100.9
	1.5	3.32	3.56	107.4
	2	3.82	3.89	101.9
3.22	0.5	3.72	3.49	93.7
	1	4.22	4.22	100.1
	1.5	4.72	4.59	97.2
	2	5.22	5.36	102.7

**Serum**

Sample [μmol/l]	Spike [μmol/l]	Expected [μmol/l]	Obtained [μmol/l]	Recovery [%]
0.70	0.5	1.20	0.97	81.1
	1	1.70	1.40	82.7
	1.5	2.20	2.19	99.5
	2	2.70	2.73	101.1
1.98	0.5	2.49	2.48	99.4
	1	2.99	2.81	93.9
	1.5	3.49	3.60	103.0
	2	3.99	4.21	105.4
2.99	0.5	3.49	3.15	90.3
	1	3.99	3.87	97.0
	1.5	4.49	4.69	104.5
	2	4.99	5.07	101.5

*Linearity*

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed with a serial dilution of 3 EDTA plasma and 3 serum samples.

For L-homoarginine in EDTA plasma and serum, the method has been demonstrated to be linear from 0.31 – 3.79 μmol/l, showing a recovery rate of 80.1 - 118.0 % in this interval.

**EDTA-Plasma**

sample [μmol/l]	dilution	expected [μmol/l]	obtained [μmol/l]	recovery [%]
1.57	1:2	0.79	0.85	108.5
	1:3	0.52	0.59	111.7
	1:4	0.39	0.42	107.0
	1:5	0.31	0.31	99.1
	1:6	0.26	0.29	109.0
	1:8	0.20	0.20	100.1
2.76	1:2	1.38	1.24	90.2
	1:3	0.92	0.75	81.3
	1:4	0.69	0.61	88.1
	1:5	0.55	0.46	82.7
	1:6	0.46	0.40	87.1
	1:8	0.34	0.32	94.0

3.79	1:2	1.89	1.87	98.8
	1:3	1.26	1.21	95.5
	1:4	0.95	0.81	85.4
	1:5	0.76	0.65	85.5
	1:6	0.63	0.51	80.1
	1:8	0.47	0.40	84.1

### Serum

sample [ $\mu\text{mol/l}$ ]	dilution	expected [ $\mu\text{mol/l}$ ]	obtained [ $\mu\text{mol/l}$ ]	recovery [%]
1.90	1:2	0.95	0.85	88.9
	1:3	0.63	0.58	91.9
	1:4	0.48	0.47	98.5
	1:5	0.38	0.40	106.1
	1:6	0.32	0.36	114.1
2.68	1:2	1.34	1.30	97.0
	1:3	0.89	0.88	99.0
	1:4	0.67	0.65	97.1
	1:5	0.54	0.56	103.7
	1:6	0.45	0.45	101.3
	1:8	0.33	0.40	118.0
3.67	1:2	1.83	2.01	109.7
	1:3	1.22	1.27	104.1
	1:4	0.92	0.87	94.3
	1:5	0.73	0.68	93.1
	1:6	0.61	0.59	97.0
	1:8	0.46	0.47	103.4
	1:12	0.31	0.34	111.9

### Analytical sensitivity

Limit of blank, LoB 0.18  $\mu\text{mol/l}$

Limit of detection, LoD 0.23  $\mu\text{mol/l}$

Limit of quantitation, LoQ 0.35  $\mu\text{mol/l}$

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

### *Analytical specificity*

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

ADMA	no cross reactivity was observed
SDMA	no cross reactivity was observed
L-Arginine	< 0.071 %

## 12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact. **Warning:** Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
- The stop solution consists of diluted sulfuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

## 13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.



- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

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













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

## 15. REFERENCES

1. Meinitzer A, Drechsler C, Tomaschitz A, Pilz S, Krane V, Wanner C, März W (2011) Homoarginine: a new cardiovascular risk marker in hemodialysis patients. *Laboratoriums-Medizin* 35:153-9
2. März W, Meinitzer A, Drechsler C, Pilz S, Krane V, Kleber ME, Fischer J, Winkelmann BR, Böhm BO, Ritz E, Wanner C (2010) Homoarginine, cardiovascular risk, and mortality. *Circulation* 122:967-975
3. Atzler D, Gore MO, Ayers CR, Choe CU, Böger RH, de Lemos JA, McGuire DK, Schwedhelm E (2014) Homoarginine and cardiovascular outcome in the population-based Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:2501-2507
4. Choe CU, Atzler D, Wild PS, Carter AM, Böger RH, Ojeda F, Simova O, Stockebrand M, Lackner K, Nabuurs C, Marescau B, Streichert T, Müller C, Lüneburg N, De Deyn PP, Benndorf RA, Baldus S, Gerloff C, Blankenberg S, Heerschap A, Grant PJ,

- Magnus T, Zeller T, Isbrandt D, Schwedhelm E (2013) Homoarginine levels are regulated by L-arginine:glycineamidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation* 128:1451-61
5. Atzler D, Rosenberg M, Anderssohn M, Choe CU, Lutz M, Zugck C, Böger RH, Frey N, Schwedhelm E (2013) Homoarginine – an independent marker of mortality in heart failure. *Int J Cardiol* 168:4907-9
  6. Drechsler C, Meinitzer A, Pilz S, Krane V, Tomaschitz A, Ritz E, März W, Wanner C (2011) Homoarginine, heart failure, and sudden cardiac death in haemodialysis patients. *Eur J Heart Fail* 13:852-9
  7. Drechsler C, Kollerits B, Meinitzer A, März W, Ritz E, König P, Neyer U, Pilz S, Wanner C, Kronenberg F, MMKD Study Group (2013) Homoarginine and progression of chronic kidney disease: results from the mild to moderate kidney disease study. *Plos One* 8:e63560
  8. Cullen ME, Yuen AH, Felkin LE, Smolenski RT, Hall JL, Grindle S, Miller LW, Birks EJ, Yacoub MH, Barton PJ (2006) Myocardial expression of the arginine:glycineamidinotransferase gene is elevated in heart failure and normalized after recovery: potential implications for local creatine synthesis. *Circulation* 114(1 Suppl):I16-20
  9. Kleber ME, Seppälä I, Pilz S, Hoffmann MM, Tomaschitz A, Oksala N, Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Mäkelä KM, Laaksonen R, Kähönen M, Raitakari OT, Huang J, Kienreich K, Fahrleitner-Pammer A, Drechsler C, Krane V, Boehm BO, Koenig W, Wanner C, Lehtimäki T, März W, Meinitzer A (2013). Genome-wide association study identifies 3 genomic loci significantly associated with serum levels of homoarginine: the AtheroRemo Consortium. *Circ Cardiovasc Genet* 6:505-13

**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		Irritant