

ox-LDL/MDA Addukt ELISA

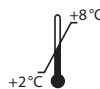
*Zur in-vitro-Bestimmung ox-LDL/MDA-Addukte
in EDTA-Plasma und Serum*

ox-LDL/MDA Adduct ELISA

*For the in vitro determination of ox-LDL/MDA adducts
in EDTA plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2017-09-06

REF K 7810



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von ox-LDL aus EDTA-Plasma und Serum geeignet. Der Test erkennt MDA modifiziertes Apolipoprotein B 100, auch wenn es weniger als 60 MDA Einheiten pro Molekül trägt.

Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die Lipidperoxidation ist ein natürlicher Prozess, der für das Zellwachstum essentiell ist. Erst wenn die Lipidperoxidation den antioxidativen Zellschutz übersteigt, ist das Gleichgewicht gestört und es kommt zur Zellschädigung. Daher wird die Lipidperoxidation auch für die Entstehung und Progression vieler Krankheiten verantwortlich gemacht.

Lipidperoxidationsprodukte entstehen, wenn im Rahmen von Reparaturvorgängen Radikale frei werden, diese die antioxidativen Schutzmechanismen überwinden und mit ungesättigten Fettsäuren reagieren. Die Beseitigung von solchermaßen modifizierten Lipiden, z.B. von oxidierten LDL-Partikeln, erfolgt durch Makrophagen. Der für die ox-LDL-Anlagerung verantwortliche Rezeptor auf der Makrophagenoberfläche weist einen Rückkopplungsmechanismus auf, der die Cholesterinaufnahme stoppen und so eine Überladung mit Cholesterin verhindern kann. Durch die Modifizierung des LDL im Rahmen der Lipidperoxidation werden die Partikel nicht mehr als natives LDL erkannt und nicht mehr reguliert aufgenommen. Stattdessen erfolgt die ungebremste Aufnahme über einen zweiten LDL-Rezeptortyp, den sogenannten Scavenger-Rezeptor (Scavenger [engl.] = Straßenfeger). Die Folge: Makrophagen wandeln sich in cholesterinangereicherte Schaumzellen um. Anhäufungen von Schaumzellen gelten als erste erkennbare atherosklerotische Läsionen. Das Aufbrechen der atherosklerotischen Plaques und die anschließende Auflagerung eines Blutgerinnsels (Thrombus) sind die häufigste Ursache des akuten Arterienverschlusses.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|----------|-------------|--|------------------------|
| K 7810 | PLATE | Mikrotitermodul, vorbeschichtet | 12 x 8 Vertiefungen |
| K 7810 | WASHBUF | Waschpufferkonzentrat, 10x | 2 x 100 ml |
| K 7810 | CONJ | Konjugatkonzentrat, Ziege-anti-ox-LDL, peroxidase markiert | 1 x 150 µl |

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|----------|-------------|--|-------------|
| K 7810 | CONJBUF | Konjugatverdünnungspuffer, gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |
| K 7810 | STD | Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen) | 4 x 5 vials |
| K 7810 | CTRL1 | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 4 x 1 vial |
| K 7810 | CTRL2 | Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen) | 4 x 1 vial |
| K 7810 | SAMPLEBUF | Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig | 1 x 30 ml |
| K 7810 | SUB | Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |
| K 7810 | 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*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

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

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **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 Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Konjugatverdünnungspuffer (CONJBUF)** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

Als Probe eignet sich venöses Nüchternblut. Die Proben müssen bei -20°C bis zur Messung gelagert werden. Die maximale Lagerungszeit bei -20°C beträgt zwei Jahre.

Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.

Proben, welche sichtbare Mengen an Feststoff (meist Kryoproteine) enthalten, sollten vor Einsatz zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 3 000g) und der resultierende Überstand im Test eingesetzt werden.

Probenverdünnung

EDTA-Plasma- oder Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:10** verdünnt, z. B. **30 µl** Probe + **270 µl** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

Pro Vertiefung werden **100 µl** der Verdünnung im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von ox-LDL/MDA Addukten.

Der Test basiert auf der klassischen „Sandwich“-ELISA Technik. Im ersten Inkubationsschritt wird das Zielantigen von immobilisierten polyklonalen Antikörpern gebunden. Alle ungebundenen Substanzen werden in einem Waschschrift entfernt. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-markierter Antikörper zugegeben. Nach einem erneuten Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten erfolgt die Zugabe des Peroxidasesubstrats Tetramethylbenzidin (TMB). 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 direkt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

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

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gege-

benheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

| | |
|-----|--|
| 1. | Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 2. | 100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren. |
| 3. | Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren. |
| 4. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 5. | 100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren. |
| 6. | Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren. |
| 7. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 8. | 100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren. |
| 9. | 10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren. |
| 10. | 100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen. |
| 11. | Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden. |

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** 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

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.

EDTA-Plasma und Serum

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 10** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

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 Proben von augenscheinlich Gesunden (n = 77; Deutschland) wurde ein Mittelwert von 287 ng/ml ermittelt.

Serum/Plasma (n = 77; Deutschland) 287 (18–2 261) ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Zusätzliche Referenzwerte

In einer wissenschaftlichen Studie wurde mit dem Immundiagnostik ELISA Kit ein Mittelwert von $95,32 \pm 37,85$ ng ox-LDL/ml bei Kontroll-Personen (gesund, n=120; Tunesien) ermittelt.

Serum/Plasma (Kontrollen, n = 120; Tunesien) 95,32 ± 37,85 ng/ml*

Die erzielten Ergebnisse zeigen ferner, dass Typ 2 Diabetes Patienten (n=86) eine signifikant erhöhte ox-LDL Konzentration ($142,37 \pm 49,84$ ng ox-LDL/ml) im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen.

Des Weiteren wurden erhöhte ox-LDL-Werte bei Typ-2-Diabetes-Patienten mit hohem Blutdruck im Vergleich zu solchen mit normalem Blutdruck festgestellt. Die Ergebnisse der Studie sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

| Probe | ox-LDL [ng/ml] |
|---|--------------------|
| Kontrollen, gesund (n=120, Tunesien) | $95,32 \pm 37,85$ |
| Typ-2-Diabetes-Patienten (n=86) | $142,37 \pm 49,84$ |
| Typ-2-Diabetes-Patienten mit normalem Blutdruck | $111,16 \pm 33,42$ |
| Typ-2-Diabetes-Patienten mit hohem Blutdruck | $157,4 \pm 49,9$ |

*Koubaa N et al. (2007) Clin. Biochem. 40, 1007-1014

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Zwei hoch positive Patientenproben wurden 1:120 bzw. 1:160 verdünnt und gemessen.

Intra-Assay (n = 18)

| Probe | ox-LDL [ng/ml] | VK [%] |
|-------|----------------|--------|
| 1 | 3678,024 | 3,9 |
| 2 | 6452,786 | 5,7 |

Inter-Assay (n = 14)

| Probe | ox-LDL [ng/ml] | VK [%] |
|-------|----------------|--------|
| 1 | 7202,643 | 11,0 |
| 2 | 4108,071 | 9,0 |

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Patientenproben wurden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

| Probe | Verdünnung | ox-LDL erwartet [ng/ml] | ox-LDL gemessen [ng/ml] |
|-------|------------|-------------------------|-------------------------|
| A | 1:15 | 3503,00 | 3503,00 |
| | 1:30 | 1751,50 | 1827,50 |
| | 1:60 | 875,75 | 920,25 |
| | 1:120 | 437,875 | 477,50 |
| B | 1:40 | 7867,00 | 7867,00 |
| | 1:80 | 3933,50 | 3868,00 |
| | 1:160 | 1966,75 | 2000,75 |
| | 1:320 | 983,375 | 952,625 |

Spike-Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit 3 unterschiedlichen ox-LDL Standards versetzt und gemessen (n = 2).

| Probe | Ungespikte Probe [ng/ml] | Spike [ng/ml] | ox-LDL erwartet [ng/ml] | ox-LDL gemessen [ng/ml] |
|-------|--------------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|
| A* | 31,4 | 10,0 | 41,4 | 39,6 |
| | 31,4 | 25,0 | 56,4 | 56,0 |
| | 31,4 | 30,0 | 61,4 | 59,3 |
| B* | 22,5 | 12,5 | 35,0 | 31,1 |
| | 22,5 | 25,0 | 47,5 | 43,6 |
| | 22,5 | 50,0 | 72,5 | 73,8 |

*Die aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 22-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 4,130 ng/ml.

| Probe | ox-LDL Mittelwert [OD] | Standardabweichung (2 SD) | Nachweisgrenze [ng/ml] |
|-------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| 1 | 0,140 | 0,024 | 4,130 |

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 Thimerosal. 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 in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der 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 im 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 Immundia-











agnostik 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. Corsi MM, Dogliotti G, Pedroni F, Ermetici F, Malavazos A, Ambrosi B, (2007) ADMA: a possible role in obese patients. *Poster P173 of the 6th World Congress on Hyperhomocysteinemia*, Saarbrücken, Germany, June 5-9, 2007, erschienen in *CCLM* **45**(5)
2. Koubaa N, Nakbi A, Smaoui M, Abid N, Chaaba R, Abid M, Hammami M (2007) Hyperhomocysteinemia and elevated ox-LDL in Tunisian type 2 diabetic patients: Role of genetic and dietary factors. *Clin Biochem* **40**(13-14):1007-14. Epub 2007 Jun 14
3. Licastro F, Dogliotti G, Goi G, Malavazos AE, Chiappelli M, Corsi MM (2007) Oxidated low-density lipoproteins (oxLDL) and peroxides in plasma of Down syndrome patients. *Arch Gerontol Geriatr* **44** Suppl 1:225-32
4. Pfützner A, Kost I, Löbig M, Knesovic M, Armbruster FP, Forst T (2005) Clinical Evaluation of a New ELISA Method for Determination of Oxidized LDL Particles - a Potential Marker for Arteriosclerotic Risk in Diabetes Mellitus. *Abstract of the 5th Diabetes Technology Meeting*, San Francisco, 10.-12. November 2005

Verwendete Symbole:

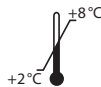
| | | | |
|---|-----------------------|---|--------------------------------------|
|  | Temperaturbegrenzung |  | Bestellnummer |
|  | In-Vitro-Diagnostikum |  | Zu verwenden mit |
|  | Hersteller |  | Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen |
|  | Chargenbezeichnung |  | Verwendbar bis |
|  | Achtung |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

ox-LDL/MDA Adduct ELISA

*For the in vitro determination of ox-LDL/MDA adducts
in EDTA plasma and serum*

Valid from 2017-09-06

REF K 7810



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

| | |
|---|-----------|
| 1. INTENDED USE | 15 |
| 2. INTRODUCTION | 15 |
| 3. MATERIAL SUPPLIED | 16 |
| 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 16 |
| 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS | 17 |
| 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES | 17 |
| <i>Sample storage</i> | 17 |
| <i>Sample preparation</i> | 18 |
| 7. ASSAY PROCEDURE | 18 |
| <i>Principle of the test</i> | 18 |
| <i>Test procedure</i> | 18 |
| 8. RESULTS | 20 |
| 9. LIMITATIONS | 20 |
| 10. QUALITY CONTROL | 21 |
| <i>Reference range</i> | 21 |
| <i>Additional reference ranges</i> | 21 |
| 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 22 |
| <i>Precision and reproducibility</i> | 22 |
| <i>Spiking Recovery</i> | 22 |
| <i>Dilution recovery</i> | 23 |
| <i>Analytical Sensitivity</i> | 23 |
| 11. PRECAUTIONS | 23 |
| 12. TECHNICAL HINTS | 24 |
| 13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE | 24 |
| 14. REFERENCES | 25 |

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of ox-LDL in EDTA-plasma and serum. The test recognises MDA-modified apolipoprotein B 100, even if it contains less than 60 MDA units per molecule.

For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Lipid peroxidation is a natural process essential for cell growth. However, when the oxidative stress overwhelms the antioxidative cell defense, the balance is disturbed and enhanced formation of lipid peroxidation products occurs. At present, lipid peroxidation is considered to be one of the basic mechanisms involved in the initiation and progression of many diseases. Various studies have provided evidence that oxidative stress resulting in lipid peroxidation and protein modification is involved in the pathogenesis of atherosclerosis and coronary heart disease.

Lipid peroxidation products are formed during normal cell metabolism via producing an excess of free radicals that can react with unsaturated fatty acids, in particular low-density lipoprotein (LDL), the major carrier of plasma cholesterol. LDL is eliminated by macrophages. Normally, receptor-mediated uptake of LDL is suppressed through down-regulation of LDL receptor expression in response to increasing cholesterol levels. Once LDL is oxidised, it is still internalised by macrophages but through scavenger receptors whose expression is not controlled by cholesterol loading. The binding of oxidised LDL (ox-LDL) is the step by which cholesterol accumulation in macrophages is induced transforming them into lipid-loaded foam cells. This process is accompanied by extensive cell proliferation and elaboration of extra cellular matrix components and contributes to the genesis and progression of atherosclerosis by promoting endothelial damage and amplifying the inflammatory response within the vessel wall. Cholesterol-loaded macrophage foam cells are present in the earliest detectable atherosclerotic lesions, the precursor of more complex atherosclerosis that cause stenosis and limited blood flow. These advanced lesions ultimately represent the sites of thrombosis leading to myocardial infarction.

3. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No. | Label | Kit components | Quantity |
|----------|-----------|--|--------------|
| K 7810 | PLATE | Microtiter plate, pre-coated | 12 x 8 wells |
| K 7810 | WASHBUF | Wash buffer concentrate, 10 x | 2 x 100 ml |
| K 7810 | CONJ | Conjugate concentrate, goat-anti ox-LDL, peroxidase-labelled | 1 x 150 µl |
| K 7810 | CONJBUF | Conjugate dilution buffer, ready-to-use | 1 x 15 ml |
| K 7810 | STD | Standards, lyophilised (see specification for concentrations) | 4 x 5 vials |
| K 7810 | CTRL1 | Control, lyophilised (see specification for range) | 4 x 1 vial |
| K 7810 | CTRL2 | Control, lyophilised (see specification for range) | 4 x 1 vial |
| K 7810 | SAMPLEBUF | Sample dilution buffer, ready-to-use | 1 x 30 ml |
| K 7810 | SUB | Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use | 1 x 15 ml |
| K 7810 | STOP | Stop solution, ready-to-use | 1 x 15 ml |

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl 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 (required filters see chapter 7)

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

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solution. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly to ensure complete reconstitution. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in conjugate dilution buffer (100 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Venous fasting blood is suited for this test system. Samples should be stored at -20 °C up to the measurement. The maximum storage time at -20 °C is two years.

Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.

Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged (5 min at 3 000 g) prior to measurement and the resulting supernatant used in the test.

Sample preparation

EDTA plasma or serum samples must be diluted **1:10** before performing the assay, e.g. **30 µl** sample + **270 µl** , mix well.

For testing in duplicates, pipet **2 x 100 µl** of each prepared sample per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of ox-LDL/MDA adducts.

This assay is a sandwich ELISA for the direct measurement of ox-LDL in human EDTA plasma and serum.

Standards, controls and samples containing human ox-LDL are added to wells of microplate coated with high affinity antibodies. During the first incubation period, the antibodies immobilised on the wall of the microtiter wells capture the antigen in the patient samples. After washing away the unbound components from samples, a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the ox-LDL concentration of sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Ox-LDL, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

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

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

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

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

We recommend to carry out the tests in duplicate.

| | |
|-----|---|
| 1. | Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper. |
| 2. | Add each 100 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells. |
| 3. | Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* . |
| 4. | Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper. |
| 5. | Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well. |
| 6. | Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* . |
| 7. | Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper. |
| 8. | Add 100 µl substrate (SUB) into each well. |
| 9. | Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark . |
| 10. | Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well. |
| 11. | 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 as a reference. |

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

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

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 the optical density and a logarithmic abscissa for the 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 the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the 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 programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

EDTA-plasma and serum

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 10** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) 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:

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

10. QUALITY CONTROL

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

Control samples or serum pools 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

Based on Immundiagnostik studies of evidently healthy persons (n = 77; Germany) a mean value of 287 ng/ml was estimated.

Serum/Plasma (n = 77; Germany): **287 (18–2 261) ng/ml**

We recommend each laboratory to establish its own reference range. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

Additional reference ranges

Within a scientific study a mean value of 95.32 ± 37.85 ng ox-LDL/ml was estimated for control subjects (healthy, n=120; Tunisia) using the Immundiagnostik's ELISA Kit.

Serum/Plasma (controls, n = 120; Tunisia) **95.32 ± 37.85 ng/ml***

Furthermore, the obtained results demonstrate that a significantly elevated ox-LDL concentration (142.37 ± 49.84 ng ox-LDL/ml) was found in type 2 diabetes patients (n=86) compared with healthy controls.

In addition, higher ox-LDL values were detected in type 2 diabetes patients with hypertension, as compared with diabetic patients without hypertension.

The results of the study are summarised in the following table.

| Sample | ox-LDL [ng/ml] |
|--|--------------------|
| Controls, healthy (n = 120) | 95.32 ± 37.85 |
| Type 2 diabetes patients (n = 86) | 142.37 ± 49.84 |
| Type2 diabetes patients without hypertension | 111.16 ± 33.42 |
| Type 2 diabetes patients with hypertension | 157.4 ± 49.9 |

*Koubaa N et al. (2007) Clin. Biochem. 40, 1007-1014

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Two highly positive patient samples were diluted 1:120 or 1:160 and measured using the assay.

Intra-Assay (n = 18)

| Sample | ox-LDL [ng/ml] | CV [%] |
|--------|----------------|--------|
| 1 | 3678.024 | 3.9 |
| 2 | 6452.786 | 5.7 |

Inter-Assay (n = 14)

| Sample | ox-LDL [ng/ml] | CV [%] |
|--------|----------------|--------|
| 1 | 7202.643 | 11.0 |
| 2 | 4108.071 | 9.0 |

Spiking Recovery

Two samples were spiked with 3 different ox-LDL standards concentrations and measured using this assay (n = 2).

| Sample | Unspiked Sample [ng/ml] | Spike [ng/ml] | ox-LDL expected [ng/ml] | ox-LDL measured [ng/ml] |
|--------|-------------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|
| A* | 31.4 | 10.0 | 41.4 | 39.6 |
| | 31.4 | 25.0 | 56.4 | 56.0 |
| | 31.4 | 30.0 | 61.4 | 59.3 |
| B* | 22.5 | 12.5 | 35.0 | 31.1 |
| | 22.5 | 25.0 | 47.5 | 43.6 |
| | 22.5 | 50.0 | 72.5 | 73.8 |

* The values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Dilution recovery

Two patient samples were diluted and analysed. The results are shown below (n = 2):

| Sample | Dilution | ox-LDL expected [ng/ml] | ox-LDL measured [ng/ml] |
|--------|----------|-------------------------|-------------------------|
| A | 1:15 | 3503.00 | 3503.00 |
| | 1:30 | 1751.50 | 1827.50 |
| | 1:60 | 875.75 | 920.25 |
| | 1:120 | 437.875 | 477.50 |
| B | 1:40 | 7867.00 | 7867.00 |
| | 1:80 | 3933.50 | 3868.00 |
| | 1:160 | 1966.75 | 2000.75 |
| | 1:320 | 983.375 | 952.625 |

Analytical Sensitivity

The zero-standard was measured 22 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 4.130 ng/ml.

| Sample | ox-LDL mean value [OD] | Standard variation (2 SD) | Detection limit [ng/ml] |
|--------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 1 | 0.140 | 0.024 | 4.130 |

11. 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 Thimerosal as bactericides. Sodium azide and Thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric 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 breath vapour and avoid inhalation.

12. 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.











13. 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.

14. REFERENCES

1. Viereck, Volker, Carsten Gründker, Sabine Blaschke, Britta Niederkleine, Heide Corsi MM, Dogliotti G, Pedroni F, Ermetici F, Malavazos A, Ambrosi B, (2007) ADMA: a possible role in obese patients. *Poster P173 of the 6th World Congress on Hyperhomocysteinemia*, Saarbrücken, Germany, June 5-9, 2007, erschienen in *CCLM* **45**(5)
2. Koubaa N, Nakbi A, Smaoui M, Abid N, Chaaba R, Abid M, Hammami M (2007) Hyperhomocysteinemia and elevated ox-LDL in Tunisian type 2 diabetic patients: Role of genetic and dietary factors. *Clin Biochem* **40**(13-14):1007-14. Epub 2007 Jun 14
3. Licastro F, Dogliotti G, Goi G, Malavazos AE, Chiappelli M, Corsi MM (2007) Oxidated low-density lipoproteins (oxLDL) and peroxides in plasma of Down syndrome patients. *Arch Gerontol Geriatr* **44** Suppl 1:225-32
4. Pfützner A, Kost I, Löbig M, Knesovic M, Armbruster FP, Forst T (2005) Clinical Evaluation of a New ELISA Method for Determination of Oxidized LDL Particles - a Potential Marker for Arteriosclerotic Risk in Diabetes Mellitus. *Abstract of the 5th Diabetes Technology Meeting*, San Francisco, 10.-12. November 2005

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 |



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49(0) 62 51/70 19 00

Fax: +49(0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com