



Arbeitsanleitung / Manual

OX-LDL ELISA Kit

Zur Bestimmung von ox-LDL in EDTA-Plasma und Serum

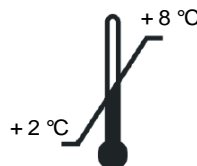
OX-LDL ELISA Kit

For the determination of ox-LDL in EDTA-plasma and serum

Gültig ab / Valid from 13.08.2008



K 7810



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

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

1. INTENDED USE	13
2. INTRODUCTION	13
3. PRINCIPLE OF THE TEST	14
4. MATERIAL SUPPLIED	14
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	15
7. PRECAUTIONS	16
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	16
9. ASSAY PROCEDURE	17
<i>TEST PROCEDURE</i>	17
10. EVALUATION OF RESULTS	19
<i>EXPECTED VALUES</i>	19
CONTROLS	20
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	20
RECOVERY	21
SENSITIVITY	21
LINEARITY	22
12. LIMITATIONS	22
13. REFERENCES	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA Test ist für die Bestimmung von ox-LDL in EDTA-Plasma und Serum geeignet. 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 freierwerden, 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 sog. 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. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der klassischen „Sandwich“-ELISA Technik. In dem 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. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K7810MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K7810ST	STD	Standards (lyophilisiert)	4 x 5 vials
K7810KO	CTRL	Kontrolle (lyophilisiert)	4 x 1 vial
K7810WP	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat (10-fach)	2 x 100 ml
K7810K	CONJ	Konjugat, (Ziege anti ox-LDL, Peroxidase-markiert)	150 µl
K7810PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer	50 ml
K7810TMB	SUB	TMB-Substrat	15 ml
K7810AC	STOP	Stopplösung	15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Standards und Kontrolle werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrollen **können nicht gelagert werden**.
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

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

8. PROBENVORBEREITUNG

EDTA-Plasma und Serum

- Als Probe eignet sich venöses Nüchternblut. Die Proben müssen bei $-20^{\circ}C$ bis zur Messung gelagert werden.
- 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 10000 g) und der resultierende Überstand im Test eingesetzt werden.
- **EDTA-Plasma- und Serumproben** müssen vor dem Einsatz im Test **1:10** mit Probenverdünnungspuffer verdünnt werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

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

Pipettierschema

1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen
2. Positionen für STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren
3. Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können in der Originalverpackung bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden
4. Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5. 100 µl STD /SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren
6. Streifen abdecken und 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren

7. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschlösungspuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschlösungspuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8. 100 µl verdünntes Konjugat in alle Wells pipettieren
9. Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
10. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschlösungspuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschlösungspuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. 100 µl SUB (Substrat) in alle Wells pipettieren
12. 15 - 25 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
13. 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells pipettieren, mischen
14. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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. 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

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

EDTA-Plasma und Serum

Um die ox-LDL-Konzentration im EDTA-Plasma bzw. Serum Proben zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit **10** multipliziert.

Erwartete Ergebnisse

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) ermittelt.

Serum/Plasma (Kontrollen, n = 120): **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 folgenden Tabellen zusammengefasst.

Probe	Ox-LDL [ng/ml]
Kontrollen, gesund (n=120)	95,32 ± 37,85
Typ-2 Diabetes Patienten (n=86)	142,37 ± 49,84

Probe	Ox-LDL [ng/ml]
Typ-2 Diabetes Patienten mit normalem Blutdruck	111,16 ± 33,42
Typ-2 Diabetes Patienten mit hohem Blutdruck	157,4 ± 49,9

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

Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, 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.

Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Lauf Kontrollen mitgeführt werden. Wenn eine oder mehrere Kontrollen eines Laufs außerhalb ihres Bereichs liegen, ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

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

Zwei Proben wurden mit 3 unterschiedlichen ox-LDL Standardmengen versetzt und gemessen.

Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Ox-LDL erwartet [ng/ml]	Ox-LDL gemessen [ng/ml]
31.4	10.0	41.4	39.6
31.4	25.0	56.4	56.0
31.4	30.0	61.4	59.3
22.5	12.5	35.0	31.1
22.5	25.0	47.5	43.6
22.5	50.0	72.5	73.8

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 1 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 22 mal der Standard null.

Probe	Ox-LDL Mittelwert [OD]	Standardabweichung (SD)	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0.140	0.024	4.130

Linearität

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

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	1:15	3503.00	3503.00
	1:30	1751.50	1827.50
	1:60	875.75	920.25
	1:120	477.50	437.875
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

12. EINSCHRÄNKUNGEN

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

13. LITERATUR (basierend auf den ox-LDL ELISA von Immundiagnostik)

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)

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

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

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*

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. 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 verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Bestandteile verschiedener Packungen nicht untereinander austauschen.
- Reagenzien nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

15.08.2008

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

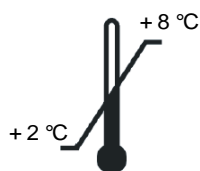
ox-LDL ELISA Kit

For the determination of ox-LDL in EDTA-plasma and serum

Valid from 13.08.2008



K 7810



1. INTENDED USE

The ox-LDL Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit is intended for the quantitative determination of ox-LDL in EDTA-plasma and serum. It is 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 particularly 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 oxidized, it is still internalized by macrophages but through scavenger receptors whose expression is not controlled by cholesterol loading. The binding of oxidized 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. PRINCIPLE OF THE TEST

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 immobilized 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 color is directly proportional to the ox-LDL concentration of sample. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated; using the values obtained from standard. Ox-LDL present in the patient samples is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
K7810MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K7810ST	STD	Standards (lyophilized)	4 x 5 vials
K7810KO	CTRL	Control (lyophilized)	4 x 1 vial
K7810WP	WASHBUF	Wash buffer concentrate (10 fold)	2 x 100 ml
K7810K	CONJ	Conjugate, (goat-anti ox-LDL, peroxidase-labeled)	150 µl
K7810PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer	50 ml
K7810TMB	SUB	TMB substrate	15 ml
K7810AC	STOP	Stop solution	15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 μ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 μ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution. The **WASHBUF** (buffer concentrate) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- **STD** (Standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 μ l** aqua bidest. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted standards and controls are **not stable**.
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1:101** in wash buffer (100 μ l CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

7. PRECAUTIONS

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

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-plasma and serum

- Venous fasting blood is suited for this test system. Samples should be stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ up to the measurement.
- 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 10000 g) prior to measurement and the resulting supernatant used in the test.
- The **EDTA-plasma and serum** samples should be diluted **1:10** with sample dilution buffer prior to analyses.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

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

Test procedure

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18-26 °C) and mix well
2. Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Control) in duplicate on a protocol sheet
3. Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips in the original package bag at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
4. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper
5. Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well
6. Cover plate tightly and incubate for 4 hours at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer

<p>7. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution</p>
<p>8. Add 100 µl diluted conjugate into each well</p>
<p>9. Cover plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer</p>
<p>10. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution</p>
<p>11. Add 100 µl of SUB (substrate) into each well</p>
<p>12. Incubate for 15 - 25 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*</p>
<p>13. Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly</p>
<p>14. 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</p>

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

10. EVALUATION OF RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

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

EDTA-plasma and serum

For the calculation of the ox-LDL concentration in EDTA-plasma and serum samples, the result has to be multiplied by **10**.

Expected values

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

Serum/Plasma (controls, n = 120): **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 Typ-2 Diabetes patients (n=86) compared with healthy controls.

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

The results of the study are summarized in the following tables.

Sample	Ox-LDL [ng/ml]
Controls, healthy (n=120)	95.32 ± 37.85
Typ-2 Diabetes patients (n=86)	142.37 ± 49.84

Sample	Ox-LDL [ng/ml]
Typ-2 Diabetes patients without hypertension	111.16 ± 33.42
Typ-2 Diabetes patients with hypertension	157.4 ± 49.9

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

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

Controls

Control samples or serum pools should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of the control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

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

Recovery

Two samples were spiked with 3 different Ox-LDL standards and measured using this assay.

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

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 1SD$. The zero-standard was measured 22 times.

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

Linearity

Two patient samples were diluted with wash buffer and analyzed. The results are shown below:

n= 2

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
A	1:15	3503.00	3503.00
	1:30	1751.50	1827.50
	1:60	875.75	920.25
	1:120	477.50	437.875
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

12. LIMITATIONS

Strong haemolytic and lipaemic samples often show wrong concentrations. We recommend not to measure those samples.

13. REFERENCES (based on the ox-LDL ELISA of Immundiagnostik)

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)

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

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

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*

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- For *in vitro* diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be followed.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15.08.2008

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number