

# Anti-ox-LDL ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von anti-ox-LDL-Antikörpern  
in EDTA-Plasma und Serum*

# Anti ox-LDL ELISA

*For the in vitro determination of anti ox-LDL antibodies  
in EDTA plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2021-07-27

**REF** K 7809

$\Sigma$   
96

+8°C  
+2°C

**IVD** **CE**



**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 REAGENZEN</b>	<b>4</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>7</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>7</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>8</b>
<i>Referenzwerte</i>	8
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>8</b>
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>9</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>10</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>10</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>11</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von ox-LDL-Antikörpern 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 freiwerden, 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.

Oxidiertes LDL ist nicht nur ein essentieller Trigger der arteriosklerotischen Gefäßalterung. Wird LDL durch Oxidation verändert, wird es immunogen. Es lassen sich spezifische Autoantikörper gegen Epitope (z.B. Malondialdehyd-Lysin) des oxidierten LDL im Serum nachweisen. Antikörper gegen oxidiertes LDL wurden in Seren von Patienten mit einer Anzahl verschiedener Symptome, wie Diabetes, Koronarerkrankungen, Arteriosklerose der Carotis u. a., detektiert. Die ox-LDL-Antikörper erkennen Gewebe aus atherosklerotischen Läsionen. Der Titer an Antikörpern gegen oxidiertes LDL gilt als unabhängiger Indikator für das Fortschreiten der Atherosklerose.

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7809	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10 x	2 x 100 ml
K 7809	STD	anti-ox-LDL-Standardkonzentrat, lyophilisiert, (Konzentration der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 7809	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert, (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 7809	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert, (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 7809	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	1 x 200 µl
K 7809	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 100 ml
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 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 an-zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100ml WASH-BUF + 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.
- **Das lyophilisierte Standardkonzentrat (STD)** und die **Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Rekonstitutionsvorgaben für STD und CTRL sowie die Herstellung der Standardkurve sind dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen. **Standardkonzentrat und Kontrollen** (rekonstituierter STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden**.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). 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

### EDTA-Plasma und Serum

Als Probe eignet sich venöses Nüchternblut. Die Proben müssen bei -20°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 3 000 g) und der resultierende Überstand im Test eingesetzt werden.

EDTA-Plasma- und Serumproben müssen vor dem Einsatz im Test **1:10 000** mit **Probenverdünnungspuffer** (SAMPLEBUF) verdünnt werden, z. B.:

**10 µl** Probe + **990 µl** SAMPLEBUF, gut mischen = Verdünnung I (1:100)

**10 µl** Verdünnung I + **990 µl** SAMPLEBUF, gut mischen = Verdünnung II (1:10 000)

Für eine Bestimmung in Doppelwerten werden **2 x je 100 µl der Verdünnung II** im Test eingesetzt.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von ox-LDL-Antikörpern.

Der Test basiert auf der ELISA-Technik. Im ersten Inkubationsschritt werden die ox-LDL-Antikörper von malondialdehyd-modifiziertem Lipoprotein mit niedriger Dichte (low-density lipoprotein; MDA-LDL, ox-LDL) gebunden, welches auf der Platte immobilisiert ist. Alle ungebundenen Substanzen werden in einem Waschschrift entfernt. Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein peroxidasemarkiertes Konjugat 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 der gemessenen ox-LDL-Antikörper. 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 müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen 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 Gegebenheiten 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 <b>vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	<b>100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben</b> in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und <b>2 Stunden</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter 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> (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter 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>10–20 min**</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
10.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, 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.

\* 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.

### Serum/Plasma

Um die ox-LDL-Antikörper-Konzentration in EDTA-Plasma- bzw. Serum-Proben zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit **10 000** multipliziert.

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) können 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:

*LoB* × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

## 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 Plasmaproben (Plasma n = 76 und Serum n = 69) von augenscheinlich Gesunden wurde ein Referenzbereich von 4 000–12 000 U/ml ermittelt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Analytische Sensitivität

Die Leerwert-Obergrenze (*limit of blank*, LoB) wurde gemäß der Richtlinie CLSI EP17-A2 bestimmt und liegt bei 0,0205 U/ml.

### Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay (n = 40)

Die Reproduzierbarkeit von drei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft.

Probe	anti-ox-LDL [U/ml]	VK [%]
1	0,723	6,9
2	0,309	4,2
3	0,147	5,3

**Inter-Assay (n = 10)**

Es wurde die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft.

Probe	anti-ox-LDL [U/ml]	VK [%]
1	0,150	11,9
2	0,257	14,4

**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 giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- 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 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 dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.












### 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

## 15. LITERATUR

1. Calò, L.A. et al., 2007. Effect of haemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate on oxidative stress in dialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation*, **22**(5), pp.1413–9.
2. Corsi, M.M. et al., 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)
3. Ghattas, M. et al., 2013. Apolipoprotein CIII3238C/G Gene Polymorphism Influences Oxidized Low-Density Lipoprotein with a Risk of Essential Hypertension. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, **1**(3), pp.143–147.
4. Koubaa N. et al., 2007. Hyperhomocysteinemia and elevated ox-LDL in Tunisian type 2 diabetic patients: Role of genetic and dietary factors. *Clinical Biochemistry* **40**(13-14):1007-14.
5. Licastro F, Dogliotti G, Goi G, Malavazos AE, Chiappelli M, Corsi MM (2007) Oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) and peroxides in plasma of Down syndrome patients. *Archives of gerontology and geriatrics* **44** Suppl 1:225-32
6. 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
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

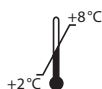


# Anti ox-LDL ELISA

*For the in vitro determination of anti ox-LDL antibodies  
in EDTA plasma and serum*

Valid from 2021-07-27

**REF** K 7809



**IVD** **CE**



**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>15</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>17</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>17</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>18</b>
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	18
<b>8. RESULTS</b>	<b>20</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>20</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>21</b>
<i>Reference range</i>	21
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>21</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	21
<i>Analytical Sensitivity</i>	22
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>22</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>22</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>23</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>23</b>



## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of ox-LDL antibodies in EDTA-plasma and serum. 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 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.

Oxidised LDL is not only an essential trigger of arteriosclerosis and vascular ageing. When modified by the oxidation LDL becomes immunogenic. Specific auto antibodies against epitopes (e.g. malondialdehyde-Lysine) of oxidised LDL in serum have been detected. Auto antibodies against oxidised low density lipoprotein have been found in sera of patients with a number of different symptoms, like diabetes, vascular diseases, carotid arteriosclerosis and others. The ox-LDL antibodies recognise tissues with atherosclerotic lesions. The titer of oxidised LDL antibodies is considered as an independent indicator for the progress of atherosclerosis.

### 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7809	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 7809	STD	anti ox-LDL standard concentrate, lyophilised	4 x 1 vial
K 7809	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 7809	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 7809	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 200 µl
K 7809	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2 x 100 ml
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 pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- 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. **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. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. 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 **for 1 month at 2–8 °C**.
- The **lyophilised standard concentrate (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details and the preparation of the standard curve are given in the **specification data sheet. Standard concentrate 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 wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until 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

### EDTA plasma and serum

Venous fasting blood is suited for this test system. Samples should be stored at -20 °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 3 000 g) prior to measurement and the resulting supernatant used in the test.

The EDTA plasma and serum samples must be diluted **1:10 000** in **sample dilution buffer** (SAMPLEBUF) prior to analyses, e. g.

**10 µl** sample + **990 µl** SAMPLEBUF, mix well = dilution I (1:100)

**10 µl** dilution I + **990 µl** SAMPLEBUF, mix well = dilution II (1:10 000)

For testing in duplicates, pipette **2 x 100 µl of dilution II per well**.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed for the quantitative determination of ox-LDL antibodies.

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

Standards, controls and samples containing human anti ox-LDL antibodies are added into the wells of a microplate coated with malondialdehyde-modified low-density lipoprotein (MDA-LDL, ox-LDL). During the first incubation period, ox-LDL immobilised on the wall of the microtiter wells, captures the antibodies in the samples. After washing away the unbound components, a peroxidase-labelled conjugate is added into each microtiter well. Tetramethylbenzidine is used as a peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the ox-LDL antibody concentration of the sample. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. The ox-LDL antibody concentration in the 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 kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed 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.	<b>Before use</b> , wash the wells <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.
2.	Add each <b>100 µl standards/controls/diluted samples</b> into the respective wells.
3.	Cover the strips tightly and incubate for <b>2 hours</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
4.	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.
5.	Add <b>100 µl conjugate</b> (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips tightly and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
7.	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.
8.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.
9.	Incubate for <b>10–20 min**</b> at room temperature (15–30 °C) in the <b>dark</b> .
10.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.
11.	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 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

For the calculation of the concentration of ox-LDL antibodies in EDTA-plasma and serum samples, the result should be multiplied by **10 000**.

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

## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher 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:

*LoB × sample dilution factor to be used*

LoB see chapter “Performance Characteristics”.

## 10. QUALITY CONTROL

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

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

### *Reference range*

Based on Immundiagnostik AG in-house studies of serum and plasma samples (plasma n = 76 and serum n = 69) of apparently healthy persons, a mean reference range of 4 000–12 000 U/ml was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### **Intra-Assay (n = 40)**

The precision (intra-assay variation) was calculated from 40 replicate determinations on each one of three samples.

Sample	anti ox-LDL [U/ml]	CV [%]
1	0.723	6.866
2	0.309	4.232
3	0.147	5.343

#### **Inter-Assay (n = 10)**

The total precision (inter-assay variation) was calculated from data on 2 samples obtained in 10 different assays.

Sample	anti ox-LDL [U/ml]	CV [%]
1	0.150	11.895
2	0.257	14.391

### *Analytical Sensitivity*

The LoB (limit of blank) was evaluated according to the guideline CLSI EP17-A2 and resulted in 0.0205 U/ml.

## 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 toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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 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.

## 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 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 send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 15. REFERENCES

1. Calò, L.A. et al., 2007. Effect of haemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate on oxidative stress in dialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation*, **22**(5), pp.1413–9.
2. Corsi, M.M. et al., 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)
3. Ghattas, M. et al., 2013. Apolipoprotein CIII3238C/G Gene Polymorphism Influences Oxidized Low-Density Lipoprotein with a Risk of Essential Hypertension. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, **1**(3), pp.143–147.
4. Koubaa N. et al., 2007. Hyperhomocysteinemia and elevated ox-LDL in Tunisian type 2 diabetic patients: Role of genetic and dietary factors. *Clinical Biochemistry* **40**(13-14):1007-14.
5. 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. *Archives of gerontology and geriatrics* **44** Suppl 1:225-32

6. 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
	Consult specification data sheet		



## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

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

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

