

Nitrotyrosin ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von Nitrotyrosin in humanem EDTA-Plasma, Serum und Trockenblutproben

Nitrotyrosine ELISA

For the in vitro determination of nitrotyrosine in human EDTA plasma, serum and dried blood spots

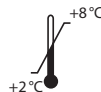
Gültig ab / Valid from 2021-10-13

REF K 7829

REF K 7829.20

Σ 96

Σ 20 x 96



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

www.immundiagnostik.com

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von proteingebundenem Nitrotyrosin in humanem Serum, EDTA-Plasma und Trockenblutproben geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik

2. EINLEITUNG

Nitrotyrosin ist die nitrierte Form der Aminosäure Tyrosin. Proteingebundene Nitrotyrosine sind bei kardiovaskulären und inflammatorischen Krankheiten in der Zirkulation erhöht (z. B. Atherosklerose, Myokardinfarkt, diabetische Vaskulopathie, Bluthochdruck oder koronare Herzkrankheit). Auch neurologische Erkrankungen werden in einen Zusammenhang mit erhöhten Nitrotyrosinwerten gebracht (z. B. Alzheimer Krankheit, Multiple Sklerose).

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen werden aus L-Arginin große Mengen Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) lokal durch das Enzym NO-Synthase (NOS) freigesetzt. Weitere Ursachen für die vermehrte $\bullet\text{NO}$ -Bildung sind Fremdstoffexpositionen (Chemikalien, Schwermetalle), Medikamente, Nikotin, physischer und psychischer Stress und eine starke körperliche Belastung mit erhöhtem Sauerstoffverbrauch. Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) in hohen Konzentrationen, welches nicht mehr ausreichend von der mitochondrialen Superoxiddismutase (MnSOD) abgefangen wird, reagiert mit einem Sauerstoffradikal ($\bullet\text{OO}\cdot$) schließlich zu Peroxynitrit ($\text{ONOO}\cdot$). Peroxynitrit besitzt eine starke Affinität zu aromatischen Aminosäuren. Es reagiert mit dem Phenolring des Tyrosins zu Nitrotyrosin. Proteingebundenes Nitrotyrosin ist ein stabiles Endprodukt mit einer relativ langen Halbwertszeit *in vivo* und stellt somit einen geeigneten Marker für nitrosativen Stress dar.

Indikationen

- Kardiovaskuläre Erkrankungen
- Neuronale Erkrankungen
- Schilddrüsenfunktionsstörungen
- Stoffwechselblockaden
- Mitochondriopathie

Biochemische Folgen von nitrosativem Stress

- Lipid- und Proteinmodifizierung (z. B. von Strukturproteinen in Mitochondrien)
- Hemmung von Atmungskettenenzymen in den Mitochondrien
- Glutamatüberladung
- Ionenkanal-Störung
- Kalzium-Überladung

- Mitochondriopathie
- Aktivierung von Apoptoseprozessen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge für Art.-Nr.	
			K 7829	K 7829.20
K 7829	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen	20 x 12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml	20 x 100 ml
K 7829	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml	20 x 100 ml
K 7829	CONJ	Konjugatkonzentrat (Ziege anti-human- Serumproteine, peroxidase markiert)	1 x 200 µl	20 x 200 µl
K 7829	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentra- tionen der Spezifikation entnehmen)	2 x 6 vials	25 x 6 vials
K 7829	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifi- kation entnehmen)	2 x 1 vial	25 x 1 vial
K 7829	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifi- kation entnehmen)	2 x 1 vial	25 x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml	20 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml	20 x 15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Trockenprobenträger wie z.B. DrySpot-ID Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID
- 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 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert 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 STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen (rekonstituierte STD und CTRL) können 4 Wochen bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Assaypuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml ASYBUF). 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

EDTA-Plasma und Serum

Serum- und Plasmaproben sind bei **Raumtemperatur für 4 Tage**, bei **2–8 °C für 7 Tage** und bei **-20 °C für 4 Wochen** stabil. Mehr als 2 Einfrier-Auftau-Zyklen sind zu vermeiden.

Trockenblutgewinnung und -lagerung

Als Probenmaterial eignen sich **50 µl Vollblut**, die auf einen von Immundiagnostik AG freigegebenen Trockenprobenträger aufgetropft und vollständig getrocknet sind. Wir empfehlen DrySpot-ID (Katalognummer DZ9020ID oder DZ9021ID) als Trockenblutträger. Die benetzten Karten sind für 2 Wochen bei Raumtemperatur stabil.

Probenvorbereitung

Vorbereitung der EDTA-Plasma- und Serumproben

15 µl frische Probe in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettieren, mit **885 µl Assaypuffer** (ASYBUF) versetzen und gut mischen (entspricht einer **1:60** Verdünnung).

100 µl der Verdünnung werden pro Vertiefung im Test eingesetzt.

Vorbereitung der Trockenblutproben

1.	2-ml-Reaktionsgefäße aus Polypropylen beschriften.
2.	Filter aus Testbrief entnehmen.
3.	Filter in beschriftetes Gefäß geben.
4.	1500 µl Assaypuffer (ASYBUF) pro Probe zugeben und 10 min bei Raumtemperatur (15–30 °C) stehen lassen.
5.	10 s vortexen. Der Filter entfärbt sich hierbei.
6.	Die Proben 5 min bei 3000 g zentrifugieren, um Filterreste zu entfernen.

Für eine Bestimmung in Doppelwerten werden 2 x je 100 µl jeder vorbereiteten Probe im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Nitrotyrosin. Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik.

Standards, Kontrollen und vorbereitete Patientenproben, die auf Nitrotyrosin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem polyklonalen Ziege anti-Nitrotyrosin Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt werden nitrierte Proteine aus der Probe von dem Primärantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann wird das Konjugat, ein Peroxidasemarkierter Ziege anti-human-Serumproteine Antikörper, zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

Primärantikörper – nitriertes Protein – Peroxidase-Konjugat.

Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin eingesetzt. 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 dem Nitrotyrosin-Gehalt direkt proportional. 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 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/vorbereitete 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 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl verdünntes CONJ (Konjugat) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem 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 60** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Trockenblut

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Faktor 40** 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) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

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

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × 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 Serumproben von augenscheinlich Gesunden ($n = 78$) wurde folgender Referenzbereich ermittelt:

Min: 264 nmol/l
Max: 3 311 nmol/l
Median: 549 nmol/l

Bei 95% dieses Kollektives (95 Percentile) wurde eine Nitrotyrosinkonzentration von 1674 nmol/l und weniger gemessen.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); $n = 24$

Die Wiederholbarkeit wurde mit 3 Serumproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [nmol/l]	VK [%]
1	2267,64	2,8
2	858,84	3,7
3	869,37	5,0

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); $n = 15$

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 5 Serumproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [nmol/l]	VK [%]
1	2392,57	10,9
2	958,56	13,0
3	930,67	8,8
4	473,97	12,1
5	931,70	12,3

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 3 Serumproben wurden dafür mit bekannten Nitrotyrosin-Konzentrationen versetzt und gemessen. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

Probe [nmol/l]	Spike [nmol/l]	Erwartet [nmol/l]	Gemessen [nmol/l]	Wiederfindung [%]
8,79	11,1	19,89	18,86	94,84
	22,2	30,99	29,46	95,08
	44,4	53,19	52,63	98,95
	66,6	75,39	78,45	104,07
	88,8	97,59	100,33	102,81
	111,1	119,89	124,23	103,62
14,52	11,1	25,62	25,10	97,99
	22,2	36,72	36,22	98,65
	44,4	58,92	59,24	100,54
	66,6	81,12	82,42	101,60
	88,8	103,32	111,69	108,10
	111,1	125,62	137,22	109,23
7,19	11,1	18,29	18,85	103,05
	22,2	29,39	28,14	95,74
	44,4	51,59	49,54	96,03
	66,6	73,79	70,05	94,92
	88,8	95,99	96,96	101,01
	111,1	118,29	113,72	96,13

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung von 4 Serumproben nachgewiesen.

Für Nitrotyrosin in Serum und EDTA-Plasma wurde Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ein lineares Verhalten im Bereich von 11,03 bis 116,98 nmol/l nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [nmol/l]	Gemessen [nmol/l]	Wiederfindung [%]
1	1:30	88,27	88,27	100,00
	1:60	44,13	37,99	86,09
	1:120	22,07	20,17	91,38
	1:240	11,03	12,33	111,75
2	1:30	62,79	62,79	100,00
	1:60	31,40	31,18	99,31
	1:120	15,70	17,51	111,56
3	1:15	42,66	42,66	100,00
	1:30	21,33	24,44	114,59
4	1:30	116,98	116,98	100,00
	1:60	58,49	49,98	85,45
	1:120	29,25	24,95	85,30
	1:240	14,62	13,75	94,05

Analytische Sensitivität

Der im Folgenden aufgeführte Wert wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB)

1,437 nmol/l

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 beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST












- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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. Peluffo, Gonzalo, and Rafael Radi. 2007. "Biochemistry of Protein Tyrosine Nitration in Cardiovascular Pathology." *Cardiovascular Research* **75** (2) (July 15): 291–302. doi:10.1016/j.cardiores.2007.04.024.
2. Gonsette, R E. 2008. "Neurodegeneration in Multiple Sclerosis: The Role of Oxidative Stress and Excitotoxicity." *Journal of the Neurological Sciences* **274** (1-2) (November 15): 48–53. doi:10.1016/j.jns.2008.06.029.
3. Ischiropoulos, Harry. 2009. "Protein Tyrosine Nitration--an Update." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **484** (2) (April 15): 117–21. doi:10.1016/j.abb.2008.10.034.

4. Köse, Fadime Aydın, Meltem Seziş, Fehmi Akçiçek, and Aysun Pabuççuoğlu. 2011. "Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Patients on Hemodialysis and Peritoneal Dialysis." *Blood Purification* **32** (3) (January): 202–8. doi:10.1159/000328030.

Verwendete Symbole:

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

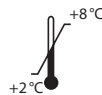
Nitrotyrosine ELISA

*For the in vitro determination of nitrotyrosine
in human EDTA plasma, serum and dried blood spots*

Valid from 2021-10-13

REF K 7829

Σ 96



IVD



REF K 7829.20

Σ 20 x 96



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

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

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of protein-bound nitrotyrosine in human EDTA plasma, serum and dried blood spots. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION / CLINICAL RELEVANCE

Nitrotyrosine is the nitrated form of the amino acid tyrosine. The accumulation of protein bound nitrotyrosine is associated with cardiovascular diseases that are based on inflammatory processes (e.g., atherosclerosis, myocardial infarction, diabetic vasculopathy, hypertension, or coronary heart diseases). A growing number of studies have also associated the accumulation of nitrotyrosine with neurological diseases (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, stroke).

With treatment of some of the associated diseases the levels of nitrated tyrosines have been shown to decrease, so nitrotyrosine has been stated to be a marker of nitrosative stress. During inflammatory processes, large amounts of nitric oxide ($\bullet\text{NO}$) are locally released from L-arginine. This reaction is catalysed by the enzyme NO-synthase (NOS). Other causes for the increased $\bullet\text{NO}$ production are exposure to chemicals or heavy metals, drugs, nicotine, or physical and psychological stress, as well as extraordinary physical strain with increased oxygen consumption. In high concentrations, $\bullet\text{NO}$ that is not trapped by mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) reacts with superoxide ($\bullet\text{OO}^-$) to form peroxynitrite (ONOO^-). Peroxynitrite is implicated as a key oxidant species in several pathologies and is known to be cytotoxic (nitrosative stress). Peroxynitrite is highly reactive and shows a high affinity to aromatic amino acids, e.g., to the phenolic ring of tyrosine. The nitration of tyrosine in general is a natural process within the post-translational protein modification. Nitrotyrosine is a stable product and might be seen as a correlate of peroxynitrite production, and its accumulation in cells and tissues is a marker of oxidative stress and nitrosative stress, respectively.

Indications

- Cardiovascular diseases
- Neurological diseases
- Thyroid disturbances
- Blockade of biochemical pathways
- Mitochondriopathy

Consequences of nitrosative stress

- Modification of lipids and proteins (for example structural proteins in mitochondria)

- Inhibition of respiratory chain enzymes in the mitochondria
- Glutamate overload
- Disturbances in ion channels
- Calcium overload
- Initiation of apoptosis processes

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity for cat. no.	
			K 7829	K 7829.20
K 7829	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells	20 x 12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml	20 x 100 ml
K 7829	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	1 x 100 ml	20 x 100 ml
K 7829	CONJ	Conjugate concentrate (goat anti-human-serum proteins, peroxidase-labelled)	1 x 200 µl	20 x 200 µl
K 7829	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentration)	2 x 6 vials	25 x 6 vials
K 7829	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial	25 x 1 vial
K 7829	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial	25 x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml	20 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml	20 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*
- Dried blood spot carrier such as DrySpot-ID cat. no.: DZ9020ID or DZ9021ID
- 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 ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** 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 ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at -20 °C for 4 weeks. Avoid repeated thawing and freezing.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in **assaybuffer** (100 µl CONJ + 10 ml ASYBUF).

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

EDTA plasma and serum

Serum and plasma samples can be stored at room temperature for 4 days, at 2–8 °C for 7 days and for 4 weeks at -20 °C. Avoid more than 2 freeze thaw cycles.

Collection and storage of dried blood spots

50 µl whole blood dripped on a dried sample carrier cleared by Immundiagnostik AG are suitable as sample material after complete drying. We recommend DrySpot-ID (catalogue no DZ9020ID or DZ9021ID) as dried blood spot carrier. The moistened cards are stable for 2 weeks at room temperature.

Preparation of samples

EDTA plasma and serum

Pipet **15 µl** of fresh EDTA plasma or serum sample in a 1.5 ml reaction vial, add **885 µl assay buffer** (ASYBUF) and mix well (dilution **1:60**).

Preparation of the dried blood samples

1.	Label 2- ml polypropylene tubes.
2.	Remove filter from sampling device.
3.	Put filter in a labelled tube.
4.	Add 1500 µl assay buffer (ASYBUF) per sample, allow sample to stand for 10 min at room temperature (15–30 °C).
5.	Vortex for 10 s . The filter will decolourise.
6.	Centrifuge the samples for 5 min at 3000 g to remove residual filter pieces.

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 nitrotyrosine. The assay utilises the “sandwich” technique.

Standards, controls and prepared samples which are assayed for nitrotyrosine are added into the wells of a micro plate coated with polyclonal goat anti- nitrotyrosine antibody. During the first incubation step, nitrated proteins are bound by the immobilised primary antibody. Then a peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-human serum proteins antibody is added into each microtiter well and a “sandwich” of primary antibody - nitrated protein – peroxidase-conjugate

is formed. Tetramethylbenzidine is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of nitrotyrosine. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. standard concentration is generated, using the values obtained from the standards.

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 together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8°C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

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/prepared 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 into each well.
6.	Cover plate or strips with foil tightly and incubate for 1 h at room temperature (15 - 30°C) on the 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 by the **dilution factor of 60** to get the actual concentrations.

Dried blood spots

The obtained results have to be multiplied by the **factor of 40** to get the actual concentrations.

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 can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

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

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

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

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

LoB × sample dilution factor to be used

LoB see chapter "Performance Characteristics".

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 studies of serum samples of apparently healthy persons (n = 78), the following values were estimated:

Min: 264 nmol/l
Max: 3 311 nmol/l
Median: 549 nmol/l

For 95 % of this collective (95 percentile) a nitrotyrosine concentration of 1 674 nmol/l and less was obtained.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 24

The repeatability was assessed with 3 serum samples under constant parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [nmol/l]	CV [%]
1	2 267.64	2.8
2	858.84	3.7
3	869.37	5.0

Reproducibility (Inter-Assay); n = 15

The reproducibility was assessed with a serum and a control sample under varying parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [nmol/l]	CV [%]
1	2 392.57	10.9
2	958.56	13.0
3	930.67	8.8
4	473.97	12.1
5	931.70	12.3

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, nitrotyrosine spikes with known concentrations were added to 3 serum samples. The results below were obtained without consideration of the sample dilution factor.

Sample [nmol/l]	Spike [nmol/l]	Expected [nmol/l]	Obtained [nmol/l]	Recovery [%]
8.79	11.1	19.89	18.86	94.84
	22.2	30.99	29.46	95.08
	44.4	53.19	52.63	98.95
	66.6	75.39	78.45	104.07
	88.8	97.59	100.33	102.81
	111.1	119.89	124.23	103.62
14.52	11.1	25.62	25.10	97.99
	22.2	36.72	36.22	98.65
	44.4	58.92	59.24	100.54
	66.6	81.12	82.42	101.60
	88.8	103.32	111.69	108.10
	111.1	125.62	137.22	109.23
7.19	11.1	18.29	18.85	103.05
	22.2	29.39	28.14	95.74
	44.4	51.59	49.54	96.03
	66.6	73.79	70.05	94.92
	88.8	95.99	96.96	101.01
	111.1	118.29	113.72	96.13

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP06-A with a serial dilution of 4 different serum samples.

For nitrotyrosine in serum and EDTA plasma, the method has been demonstrated to be linear from 11.03 to 116.98 nmol/l based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [nmol/l]	Obtained [nmol/l]	Recovery [%]
1	1:30	88.27	88.27	100.00
	1:60	44.13	37.99	86.09
	1:120	22.07	20.17	91.38
	1:240	11.03	12.33	111.75
2	1:30	62.79	62.79	100.00
	1:60	31.40	31.18	99.31
	1:120	15.70	17.51	111.56
3	1:15	42.66	42.66	100.00
	1:30	21.33	24.44	114.59
4	1:30	116.98	116.98	100.00
	1:60	58.49	49.98	85.45
	1:120	29.25	24.95	85.30
	1:240	14.62	13.75	94.05

Analytical sensitivity

The following value has been estimated based on the concentrations of the standard without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB

1.437 nmol/l

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 sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Peluffo, Gonzalo, and Rafael Radi. 2007. "Biochemistry of Protein Tyrosine Nitration in Cardiovascular Pathology." *Cardiovascular Research* **75** (2) (July 15): 291–302. doi:10.1016/j.cardiores.2007.04.024.
2. Gonsette, R E. 2008. "Neurodegeneration in Multiple Sclerosis: The Role of Oxidative Stress and Excitotoxicity." *Journal of the Neurological Sciences* **274** (1-2) (November 15): 48–53. doi:10.1016/j.jns.2008.06.029.
3. Ischiropoulos, Harry. 2009. "Protein Tyrosine Nitration--an Update." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **484** (2) (April 15): 117–21. doi:10.1016/j.abb.2008.10.034.
4. Köse, Fadime Aydın, Meltem Seziş, Fehmi Akçiçek, and Aysun Pabuççuoğlu. 2011. "Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Patients on Hemodialysis and Peritoneal Dialysis." *Blood Purification* **32** (3) (January): 202–8. doi:10.1159/000328030.

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		