



# Oxidized LDL (oxLDL) Antibody ELISA

IVD

## PRODUCT INSERT

REF 38085 Oxidized LDL Antibody (oxLDL) ELISA 96 Determinations

### INTENDED USE

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative and semi-quantitative detection of antibodies to oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) in human serum.

### SUMMARY AND EXPLANATION

Anti-oxidized LDL antibodies are associated with certain clinical conditions such as atherosclerosis, carotid stenosis and other coronary artery dysfunction. Anti-oxidized LDL antibodies may also be significant in diseases such as diabetes hypertension and endometriosis.<sup>1-5</sup>

Hypercholesterolemia is closely associated with increased risk of atherosclerosis.<sup>4,6</sup> Cholesterol accumulated in the atherosclerotic plaque is derived primarily from low-density lipoprotein (LDL). Oxidation of LDL is accepted as a critical event in the atherogenic process.<sup>7</sup> Free radicals like superoxide and nitric oxide ( $-O_2$ , NO) generated in biological reactions in the body contribute to the oxidation of LDL.<sup>8,9</sup> The NO radical has been shown to oxidize apolipoprotein B, a constituent of LDL. Similarly, lipo-oxygenases and oxidants like per-oxynitrite can oxidize the lipid moieties in LDL. It has been demonstrated that oxidized LDL and not native LDL is taken up by scavenger receptors on monocytes, smooth muscle cells and macrophages in the blood vessels. The oxidation of LDL increases the affinity of oxidized LDL to acetyl receptors of macrophages.<sup>10</sup> As this pathway of oxidized LDL uptake is unregulated, it results in the formation of lipid-laden macrophages (foam cells). The presence of foam cells is the earliest step in the formation of atherosclerotic plaque in blood vessels. Later, other inflammatory molecules released by leukocytes promote the progression of atherosclerotic plaque.<sup>11,12</sup>

Antibodies against oxLDL and its complexes have been demonstrated in systemic lupus erythematosus, diabetes, arterial thrombosis, hypertension, etc.

### PRINCIPLES OF PROCEDURE

The test is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with oxLDL antigen followed by a blocking step to reduce non-specific protein binding during the assay run. Controls, calibrators and patient sera are incubated in the antigen coated wells to allow specific antibodies in samples to bind to the antigen. Unbound antibodies and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgG conjugate to the microwells. Unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (TMB) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of TMB substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 450 nm. Results are expressed in ELISA units per milliliter (EU/ml) and reported as positive or negative.

### REAGENTS

#### Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.**

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use.

Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Coated microwell strips are for one time use only.

## Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials.<sup>13</sup>

**Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results.** Do not interchange kit components with those from other sources. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.






## Materials provided

Zenit oxLDL ELISA [REF] 38085

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations.

12 x 8	MICROPLATE oxLDL	Microplate with individual breakaway microwells. Coated with oxidized LDL antigen. Ready for use.
1 x 1.75 ml	CONTROL + oxLDL	Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Contains human serum positive for oxLDL antibodies. The expected concentration range in EU/ml is printed on the label.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	Ready to use <b>Negative Control</b> ( <i>white cap</i> ). Contains human serum.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A oxLDL CALIBRATOR B oxLDL CALIBRATOR C oxLDL CALIBRATOR D oxLDL CALIBRATOR E oxLDL	Ready to use <b>set of 5 Calibrators</b> . Derived from human serum containing oxLDL antibodies. Concentrations in EU/ml are printed on the labels. Calibrator A ( <i>green cap</i> ) 320 EU/ml; Calibrator B ( <i>violet cap</i> ) 80 EU/ml; Calibrator C ( <i>blue cap</i> ) 40 EU/ml; Calibrator D ( <i>yellow cap</i> ) 20 EU/ml, and Calibrator E ( <i>orange cap</i> ) 1 EU/ml.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP goat anti-human IgG. Ready for use. Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL	Serum Diluent. Ready for use. Color coded green.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	TMB enzyme substrate. Ready for use. <b>Protect from light.</b>
1 x 15 ml	STOP	Stop Solution. Ready for use.
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer. <b>Reconstitute to one liter each.</b>

## Symbols used on labels

LOT	Lot number
REF	Catalog number
IVD	In vitro diagnostic use
	Use by
	Storage temperature
	Read instructions before use
	Number of tests
	Manufacturer

### Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 450 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

### SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

### PROCEDURE

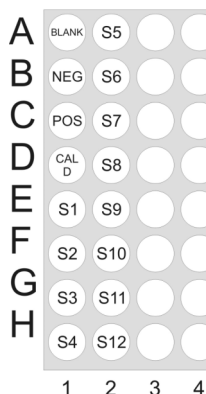
#### Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. It is suggested that reagents be left on the bench out of the box for 30 minutes prior to use. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.
- **Good washing technique is critical.** If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 or 12 wells simultaneously. This speeds the process and provides more uniform incubation times.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
- **Ensure microplate incubations occur in the dark. This includes specimen, conjugate and substrate incubation steps. Exposure to light through incubation may impact results.**

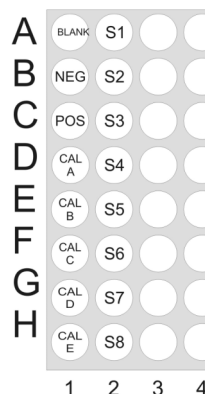
#### Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate to room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use Calibrator D (*yellow cap*) only.  
or  
For a **semi-quantitative determination** use Calibrators A through E as depicted in the sample layout below.

## Qualitative



## Semi-quantitative



- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500 µl** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.  
**Note:** Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** ( $\pm$  5 min) at room temperature in the dark.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** ( $\pm$  5 min) at room temperature in the dark.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** ( $\pm$  5 min) at room temperature in the dark in the dark.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within 1 hour of adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **450 nm** using a single or at 450/630nm using a dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

### Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be  $<0.3$ . The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be  $<20$  EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations the positive control must give values in the range stated on the vial.

## RESULTS

### Calculations

The concentrations of the samples can be determined by either of two methods:

#### 1. QUALITATIVE DETERMINATION

Abs. of Test Sample

$$\text{-----} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

Abs. of Calibrator D

#### 2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot the absorbance of Calibrator A through E against their respective concentrations on linear-log graph paper. Plot the concentrations in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw a point-to-point curve fit. Determine the concentrations of the patient samples from the curve according to corresponding absorbance values. Alternately, a four parameter curve may be used to plot the standard curve.

### Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing high antibody levels may give absorbance values greater than that of Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values, such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml values, multiply the units obtained by the dilution factor.

### Interpretation

Interpretation values were determined by testing 64 adult normal blood donors. The mean of the normal subjects plus 2 SD was established as the assay cutoff and assigned an arbitrary value of 20 EU/ml. A. Menarini Diagnostics suggests use of the reference range below. Each laboratory should validate assay values for their own conditions.

<b>oxLDL Ab value</b>	<b>Interpretation</b>
<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

### LIMITATIONS OF PROCEDURE

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

Results obtained by this assay alone are not diagnostic and should be considered in conjunction with clinical presentation of the patient. Any borderline patient result should be retested to confirm the result. It is also recommended that patients with borderline results be retested at appropriate intervals.

### EXPECTED VALUES

Test results in a normal population are expected to be negative. Oxidized LDL antibodies are present in patients with atherosclerosis, diabetes, SLE and stress inducible disorders.

### Performance Characteristics

A. Disease association: The Zenit oxLDL Antibody ELISA for the detection of oxidized LDL antibodies was evaluated by testing sera of patients with associated conditions as reported in the literature, disease control sera

from patients with unassociated autoimmune diseases and control sera from healthy normal subjects. Results of these tests and the number of sera taken from each population are summarized below.

Population	n	oxLDL Ab Pos n (%)
Coronary Artery Disease	9	7 (78%)
Phospholipid Antibody Positive	57	33 (58%)
Disease Controls	50	1 (2%)
Normals	100	4 (4%)

B. Cross Reactivity: A total of 50 potentially cross-reactive specimens from individuals with other autoimmune disorders or positive for other autoantibodies were tested for oxLDL antibodies using the Zenit oxLDL system.

Condition	n	oxLDL Ab positive n (%)
Antinuclear Ab positive	10	0 (0%)
Cyclic Citrullinated Peptide Ab positive	10	0 (0%)
Hashimoto's disease	10	0 (0%)
Hsp-70 Ab positive	10	0 (0%)
Rheumatoid Factor positive	10	1 (10%)
Total	50	1 (2%)

### Precision

Inter-assay precision was tested with 3 positive specimens selected throughout the range of the assay. Multiple assay runs were performed at separate times. Intra-assay precision was calculated based on 10 replicates of 3 specimens. Based on these replicates the Coefficient of Variation (CV) was calculated. Inter-assay and intra-assay CV ranged from 5-13%.

### Linearity

To determine acceptable linearity, plates were assayed with calibrators of known values. The r-squared values of the resulting standard curves were determined for multiple assays. An r-squared value greater than 0.95 is deemed to be acceptable. The average r-squared value for these assays in precision testing was 0.9977 with no value lower than 0.9972.

### Recovery

Samples with known oxLDL antibody levels were mixed with appropriate dilutions of other positive samples with known amounts of oxLDL antibodies. The antibody levels of the mixed samples were determined and used to calculate percent recovery. The results follow:

Samples	S1 (EU/ml)	S2 (EU/ml)	EU/ml Expected	EU/ml Obtained	% Recovery (Obtained/Expected)
Mixture 1	43.6	42.2	42.9	49.4	115.2%
Mixture 2	37.1	60.2	48.6	50.4	103.6%
Mixture 3	20.1	52.9	36.5	38.0	104.0%
Mixture 4	78.9	65.3	72.1	84.3	116.9%
Mixture 5	178.5	152.8	165.7	171.3	103.4%



### Interference

Interference was studied by mixing sera with known oxLDL antibody levels with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. Results appear below.

Mixture*	S1 (EU/ml)	S2 (EU/ml)	EU/ml Expected	EU/ml Obtained	%Interference
H1	24.0	19.1	21.6	24.1	111.8%
L1	24.0	14.0	19.0	19.9	104.9%
H2	42.3	19.1	30.7	26.8	87.2%
L2	42.3	14.0	28.1	24.0	85.4%
H3	79.3	21.5	50.4	48.3	95.9%
L3	79.3	18.6	48.9	48.9	99.9%
H4	189.8	12.2	101.0	131.8	130.5%
L4	189.8	2.1	95.9	117.1	122.1%
H5	167.9	24.6	96.3	101.3	105.3%
L5	167.9	11.6	89.8	104.1	115.9%

\* H=Hemolytic, L=Lipemic.



# Oxidized LDL Antibody (oxLDL) ELISA

IVD

## ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 38085 Oxidized LDL Antibody (oxLDL) ELISA 96 Προσδιορισμοί

### ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ποιοτική και ημιποσοτική ανίχνευση αντισωμάτων κατά της οξειδωμένης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (oxLDL) σε ανθρώπινο ορό.

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα αντισώματα κατά της οξειδωμένης LDL σχετίζονται με ορισμένες κλινικές παθήσεις όπως η αθηροσκλήρωση, η καρωτιδική στένωση και άλλες δυσλειτουργίες των στεφανιαίων αρτηριών. Τα αντισώματα κατά της οξειδωμένης LDL μπορεί να έχουν επίσης σημασία σε νόσους όπως ο διαβήτης, η υπέρταση και η ενδομητρίωση.<sup>1-5</sup>

Η υπερχοληστεριναιμία σχετίζεται στενά με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρωσης.<sup>4,6</sup> Η χοληστερίνη που συσσωρεύεται στην αθηροσκληρωτική πλάκα προέρχεται κυρίως από χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL). Η οξείδωση της LDL είναι αποδεκτό ότι αποτελεί κρίσιμο συμβάν στην διαδικασία της αθηρογένεσης.<sup>7</sup> Ελεύθερες ρίζες όπως υπεροξειδίο και νιτρικό οξειδίο ( $-O_2$ , NO) που παράγονται σε βιολογικές αντιδράσεις στο σώμα συμβάλλουν στην οξείδωση της LDL.<sup>8,9</sup> Η ρίζα NO έχει καταδειχθεί ότι οξειδώνει την απολιποπρωτεΐνη Β, ένα συστατικό της LDL. Παρομοίως, λιπο-οξυγονάσες και οξειδωτικά όπως ο υπεροξυνιτρίτης μπορούν να οξειδώσουν το λιπιδικό τμήμα της LDL. Έχει καταδειχθεί ότι η οξειδωμένη LDL και όχι η εγγενής LDL προσλαμβάνεται από τους υποδοχείς-εκκαθαριστές στα μονοκύτταρα, τα κύτταρα του λείου μυϊκού ιστού και τα μακροφάγα στα αιμοφόρα αγγεία. Η οξείδωση της LDL αυξάνει τη συγγένεια της οξειδωμένης LDL στους ακετυλ-υποδοχείς των μακροφάγων.<sup>10</sup> Καθώς αυτή η οδός πρόσληψης οξειδωμένης LDL δεν ρυθμίζεται, οδηγεί στο σχηματισμό γεμάτων με λιπίδια μακροφάγων (αφρώδη κύτταρα). Η παρουσία αφρώδων κυττάρων είναι το νωρίτερο βήμα στο σχηματισμό αθηροσκληρωτικής πλάκας στα αιμοφόρα αγγεία. Αργότερα, άλλα φλεγμονώδη μόρια που απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα προωθούν την εξέλιξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας.<sup>11,12</sup>

Τα αντισώματα κατά της oxLDL και των συμπλόκων της έχουν καταδειχθεί σε συστηματικό ερυθματώδη λύκο, διαβήτη, αρτηριακή θρόμβωση, υπέρταση κ.λπ.

### ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η εξέταση εκτελείται ως ανοσοπροσδιορισμός στερεάς φάσης. Οι μικροϋποδοχές επικαλύπτονται από αντιγόνο oxLDL και ακολουθεί βήμα αποκλεισμού για να μειωθεί η μη ειδική πρωτεϊνική δέσμευση κατά την εκτέλεση του προσδιορισμού. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και οι οροί ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο υποδοχές για να επιτραπεί η δέσμευση των ειδικών αντισωμάτων των δειγμάτων στο αντιγόνο. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού απομακρύνονται με έκπλυση των μικροϋποδοχών. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν ανιχνεύονται με την προσθήκη ενός σημασμένου με ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης IgG στις μικροϋποδοχές. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις υποδοχές το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (TMB) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος TMB σε ένα χρωματισμένο προϊόν αντίδρασης. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml) και αναφέρονται ως θετικό ή αρνητικό.

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

#### Φύλαξη και προετοιμασία

Φυλάσσετε όλα τα αντιδραστήρια σε 2-8°C. **Μην καταψύχετε.**

Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση.



Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit. Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροϋποδοχών προορίζονται για μια μόνο χρήση.

### Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, τη διανομή και την απόρριψη των υλικών αυτών.<sup>13</sup>

**Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του kit.** Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης. Να ακολουθείτε τις ορθές εργαστηριακές τεχνικές προκειμένου να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος μικροβιακής και διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά του kit μετά την ημερομηνία λήξης στις ετικέτες.









### Υλικά που παρέχονται

Zenit oxLDL ELISA [REF] 38085

Τα kit περιέχουν επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8	[MICROPLATE oxLDL]	Μικροπλάκα με ξεχωριστές αποσπώμενες μικροϋποδοχές. Επικαλυμμένη με αντιγόνο οξειδωμένης LDL. Έτοιμη για χρήση
1 x 1,75 ml	[CONTROL + oxLDL]	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα θετικού ελέγχου</b> (ερυθρό πύμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για αντισώματα κατά της oxLDL. Το αναμενόμενο εύρος συγκέντρωσης σε EU/ml είναι τυπωμένο στην ετικέτα.
1 x 1,75 ml	[CONTROL -]	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα αρνητικού ελέγχου</b> (λευκό πύμα). Περιέχει ορό ανθρώπου
5 x 1,75 ml	[CALIBRATOR A oxLDL] [CALIBRATOR B oxLDL] [CALIBRATOR C oxLDL] [CALIBRATOR D oxLDL] [CALIBRATOR E oxLDL]	Έτοιμο προς χρήση <b>σετ 5 βαθμονομητών</b> . Προέρχεται από ορό ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της oxLDL. Οι συγκεντρώσεις σε EU/ml είναι τυπωμένες στις ετικέτες. Βαθμονομητής A (πράσινο πύμα) 320 EU/ml; Βαθμονομητής B (ιώδες πύμα) 80 EU/ml; Βαθμονομητής C (μπλε πύμα) 40 EU/ml; Βαθμονομητής D (κίτρινο πύμα) 20 EU/ml και βαθμονομητής E (πορτοκαλί πύμα) 1 EU/ml.
1 x 15 ml	[IgG-CONJ HRP]	Συζευκτικό αντίσωμα αιγός με HRP κατά της ανθρώπινης IgG. Έτοιμο για χρήση. Ροζ χρώματος.
1 x 60 ml	[DIL]	Αραιωτικό διάλυμα ορού. Έτοιμο για χρήση. Πράσινου χρώματος.
1 x 15 ml	[SUBSTRATE TMB]	Ενζυμικό υπόστρωμα TMB. Έτοιμο για χρήση. <b>Να προστατεύεται από το φως.</b>
1 x 15 ml	[STOP]	Διάλυμα τερματισμού. Έτοιμο για χρήση.
2 x	[BUF WASH]	Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. <b>Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.</b>

### Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες

-  Αριθμός παρτίδας
-  Αριθμός καταλόγου
-  In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή
-  Χρήση έως
-  Όρια θερμοκρασίας
-  Διαβάστε τις οδηγίες πριν από τη χρήση
-  Αριθμός αναλύσεων
-  Κατασκευαστής

### Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης
- Πιπέτες με δυνατότητα διανομής 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικό χαρτί
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 450 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης μικροπλακών με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

### ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτήν τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά δείγματα ή δείγματα με μικροβιακή μόλυνση ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της εξέτασης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάσσετε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

#### Σημειώσεις για τη διαδικασία

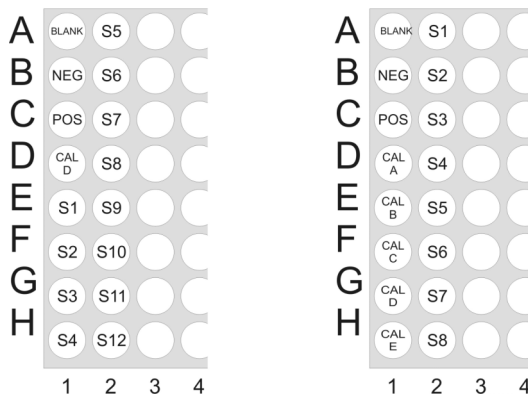
- Προτού ξεκινήσετε αυτόν τον προσδιορισμό, διαβάστε προσεκτικά αυτές τις οδηγίες.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών θα πρέπει να προετοιμάζονται πριν την έναρξη του προσδιορισμού.
- Αφήστε τα δείγματα ασθενών και τα αντιδραστήρια της εξέτασης να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της διαδικασίας εξέτασης. Συνιστάται τα αντιδραστήρια να αφήνονται στον πάγκο έξω από το κουτί τους για 30 λεπτά πριν από τη χρήση. Επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Αφαιρέστε τις απαιτούμενες ταινίες μικροϋποδοχών από τη θήκη και επανασφραγίστε την προσεκτικά για να αποφευχθεί η έκθεση των μη χρησιμοποιημένων υποδοχών σε υδρατμούς. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.

- **Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης.** Αν η πλύση γίνεται με μη αυτόματο τρόπο, η επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας ένα ισχυρό ρεύμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο σε όλη τη μικροπλάκα. **Συνιστάται η χρήση μιας αυτόματης συσκευής πλύσης μικροπλακών.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα χορήγησης σε 8 ή 12 υποδοχές ταυτόχρονα. Με τον τρόπο αυτό επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Για όλα τα βήματα, η προσεκτική τήρηση των χρόνων είναι σημαντική. Όλοι οι περίοδοι επώασης ξεκινούν με την ολοκλήρωση της προσθήκης των αντιδραστηρίων.
- Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων θα πρέπει να εκτελείται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια αλληλουχία.
- **Φροντίστε οι επωάσεις των μικροπλακών να γίνονται στο σκοτάδι. Αυτό περιλαμβάνει βήματα επώασης δείγματος, συζυγούς και υποστρώματος. Η έκθεση στο φως κατά την επώαση ενδέχεται να επηρεάσει τα αποτελέσματα.**

### Μεθοδολογία της εξέτασης

- Βήμα 1** Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 2** Σημάνετε το φύλλο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στις υποδοχές. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.
- Βήμα 3** Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο το Βαθμονομητή D (*κίτρινο πώμα*).  
ή  
Για **ημιποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους Βαθμονομητές A έως E όπως φαίνεται στο παρακάτω υπόδειγμα.

Ποιοτικός προσδιορισμός    Ημιποσοτικός προσδιορισμός



- Βήμα 4** Προετοιμάστε μια αραιώση των δειγμάτων ασθενών σε αναλογία **1:101** αναμιγνύοντας **5 μl** του ορού ασθενούς με **500μl** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
- Βήμα 5** Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροϋποδοχές από τη θήκη και επιστρέψτε τις μη χρησιμοποιημένες ταινίες στη σφραγισμένη θήκη στο ψυγείο. Τοποθετήστε με ασφάλεια τις μικροϋποδοχές στην έξτρα βάση που παρέχεται.
- Βήμα 6** Διανείμετε με πιπέτα **100 μl** Έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενών (**1:101**) στις κατάλληλες μικροϋποδοχές όπως υποδεικνύεται στο φύλλο του πρωτοκόλλου.  
**Σημείωση:** Συμπεριλάβετε μια υποδοχή η οποία περιέχει **100 μl** του αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριο. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA έναντι του τυφλού αντιδραστηρίου.
- Βήμα 7** Επωάστε για **30 λεπτά** ( $\pm 5$  λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Βήμα 8** Κάντε **4 πλύσεις** με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Για μη αυτόματη πλύση, γεμίστε κάθε μικροϋποδοχή με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Απομακρύνετε το υγρό αναστρέφοντας και χτυπώντας



ελαφρά το περιεχόμενο κάθε υποδοχής ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε υποδοχή. Για τη στύπωση στο τέλος της τελευταίας πλήσης, αναστρέψτε τις ταινίες και χτυπήστε τις υποδοχές ζωηρά σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές πλήσης, προγραμματίστε τη συσκευή πλήσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

- Βήμα 9** Διανείμετε με πιπέτα **100 μl** συζυγούς σε μικροϋποδοχές.
- Βήμα 10** Επωάστε για **30 λεπτά** ( $\pm 5$  λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Βήμα 11** Πλύνετε όλες τις μικροϋποδοχές όπως στο Βήμα 8.
- Βήμα 12** Διανείμετε με πιπέτα **100 μl** ενζυμικό υπόστρωμα σε κάθε μικροϋποδοχή με την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για το Συζυγές.
- Βήμα 13** Επωάστε για **30 λεπτά** ( $\pm 5$  λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Βήμα 14** Διανείμετε με πιπέτα **100 μl** διάλυμα τερματισμού σε κάθε μικροϋποδοχή με την ίδια σειρά και χρονισμό όπως για την προσθήκη του ενζυμικού υποστρώματος. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός 1 ώρας από την προσθήκη διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε μικροϋποδοχής σε μήκος κύματος **450 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών μονού μήκους κύματος ή σε μήκος κύματος 450/630nm χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών διπλού μήκους κύματος έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε σε απορρόφηση μηδέν.

### Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε προσδιορισμό θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου θα πρέπει να είναι  $<0,3$ . Ο Βαθμονομητής A θα πρέπει να έχει μέτρηση απορρόφησης  $\geq 1,0$ , διαφορετικά ο προσδιορισμός θα πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή  $<20$  EU/ml. Εάν η δοκιμασία διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για τον προσδιορισμό EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από την απορρόφηση του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

#### 1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

##### Απορ./ση εξεταζόμ. δείγματος

----- X EU/ml του Βαθμονομ. D = EU/ml εξεταζ. δείγματος  
 Απορ./ση Βαθμονομητή D

#### 2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών A έως και E ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης τους. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων για τη γραφική αναπαράσταση της τυπικής καμπύλης.

#### Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα

αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή Α. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημιποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σε τιμές EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν επί το συντελεστή αραιώσης.

### Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με εξέταση 64 φυσιολογικών ενηλίκων δοτών αίματος. Ο μέσος όρος των φυσιολογικών ατόμων συν 2 τυπικές αποκλίσεις (TA) θεωρήθηκε ως η τιμή αποκοπής της μεθόδου και αντιστοιχήθηκε μια αυθαίρετη τιμή 20 EU/ml. Η Α. Menarini Diagnostics προτείνει τη χρήση του παρακάτω εύρους αναφοράς. Το κάθε εργαστήριο θα πρέπει να επικυρώσει τις τιμές της μεθόδου για τις δικές του συνθήκες.

Τιμή oxLDL Ab	Ερμηνεία
<20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (οριακό)
>25 EU/ml	Θετικό

### ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτήν τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, λιπαιμικά δείγματα ή δείγματα με μικροβιακή μόλυνση ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάσσετε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2-8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με αυτόν τον προσδιορισμό μόνο δεν είναι διαγνωστικά και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη από κοινού με την κλινική εικόνα του ασθενούς. Οποιοσδήποτε ασθενής με οριακό αποτέλεσμα θα πρέπει να υποβάλλεται σε εκ νέου δοκιμασία για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Συνιστάται επίσης ασθενείς με οριακά αποτελέσματα να υποβάλλονται σε νέα δοκιμασία σε κατάλληλα διαστήματα.

### ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας σε έναν φυσιολογικό πληθυσμό αναμένεται να είναι αρνητικά. Τα αντισώματα οξειδωμένης LDL είναι παρόντα σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση, διαβήτη, Σ.Ε.Λ. και διαταραχές που επάγονται από το στρες.

### Χαρακτηριστικά απόδοσης

Α. Συσχέτιση με νόσο: Η μέθοδος Zenit oxLDL Antibody ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά της οξειδωμένης LDL αξιολογήθηκε με εξέταση ορών ασθενών με σχετικές παθήσεις όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ορούς ελέγχου νόσου από ασθενείς με μη σχετιζόμενες αυτοάνοσες νόσους και ορούς ελέγχου από υγιή φυσιολογικά άτομα. Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμασιών και ο αριθμός των ορών που λαμβάνονται από κάθε πληθυσμό συνοψίζονται παρακάτω.

Πληθυσμός	n	oxLDL Ab Θετ. n (%)
Στεφανιαία αρτηριακή νόσος	9	7 (78%)
Θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα	57	33 (58%)
Μάρτυρες νόσου	50	1 (2%)
Φυσιολογικοί	100	4 (4%)

Β. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα Ένα σύνολο 50 δειγμάτων με δυνητική διασταυρούμενη αντίδραση από άτομα με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές ή θετικά για άλλα αυτοαντισώματα εξετάστηκε για αντισώματα κατά της oxLDL με χρήση του συστήματος Zenit oxLDL.

Πάθηση	n	oxLDL Ab θετ. n (%)
Θετικό αντιπυρηνικό Ab	10	0 (0%)
Θετικό Ab κατά του κυκλικού κιτρουλλινικού πεπτιδίου	10	0 (0%)
Νόσος Hashimoto	10	0 (0%)
Hsp-70 Ab θετ.	10	0 (0%)
Θετικός ρευματοειδής παράγοντας	10	1 (10%)
Σύνολο	50	1 (2%)

### Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα εξετάστηκε με 3 θετικά δείγματα που επιλέχθηκαν σε όλο το εύρος του προσδιορισμού. Εκτελέστηκαν πολλές διεξαγωγές του προσδιορισμού σε ξεχωριστές χρονικές στιγμές. Η ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα υπολογίστηκε με βάση 10 επαναλήψεις 3 δειγμάτων. Με βάση αυτές τις επαναλήψεις υπολογίστηκε ο συντελεστής διακύμανσης (ΣΔ). Ο ΣΔ δια-αναλυτικά και ενδο-αναλυτικά κυμάνθηκε από 5-13%.

### Γραμμικότητα

Για τον καθορισμό της αποδεκτής γραμμικότητας, οι πλάκες προσδιορίστηκαν με βαθμονομητές γνωστών τιμών. Η τιμή R<sup>2</sup> των τυπικών καμπυλών που προκύπτουν προσδιορίστηκαν για πολλαπλούς προσδιορισμούς. Μια τιμή R<sup>2</sup> μεγαλύτερη από 0,95 θεωρήθηκε αποδεκτή. Η μέση τιμή R<sup>2</sup> για αυτούς τους προσδιορισμούς στον έλεγχο επαναληψιμότητας ήταν 0,9977 με καμία τιμή μικρότερη από 0,9972.

### Ανάκτηση

Δείγματα με γνωστά επίπεδα αντισωμάτων κατά της oxLDL αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις άλλων θετικών δειγμάτων με γνωστές ποσότητες αντισωμάτων κατά της oxLDL. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα αντισωμάτων στα αναμιχθέντα δείγματα και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της επί τοις εκατό ανάκτησης. Τα αποτελέσματα είναι ως εξής:

Δείγματα	S1 (EU/ml)	S2 (EU/ml)	EU/ml Αναμενόμενα	EU/ml Λαμβανόμενα	%Ανάκτηση (Λαμβανόμενα/Αναμενόμενα)
Μείγμα 1	43,6	42,2	42,9	49,4	115,2%
Μείγμα 2	37,1	60,2	48,6	50,4	103,6%
Μείγμα 3	20,1	52,9	36,5	38,0	104,0%
Μείγμα 4	78,9	65,3	72,1	84,3	116,9%
Μείγμα 5	178,5	152,8	165,7	171,3	103,4%

### Παρεμβολή

Η παρεμβολή μελετήθηκε με ανάμιξη ορών με γνωστά επίπεδα αντισωμάτων κατά της oxLDL με δείγματα ορών με δυνητική παρεμβολή και μελετώντας την απόκλιση από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.



Μείγμα*	S1 (EU/ml)	S2 (EU/ml)	EU/ml Αναμενόμενα	EU/ml Λαμβανόμενα	%Παρεμβολή
H1	24,0	19,1	21,6	24,1	111,8%
L1	24,0	14,0	19,0	19,9	104,9%
H2	42,3	19,1	30,7	26,8	87,2%
L2	42,3	14,0	28,1	24,0	85,4%
H3	79,3	21,5	50,4	48,3	95,9%
L3	79,3	18,6	48,9	48,9	99,9%
H4	189,8	12,2	101,0	131,8	130,5%
L4	189,8	2,1	95,9	117,1	122,1%
H5	167,9	24,6	96,3	101,3	105,3%
L5	167,9	11,6	89,8	104,1	115,9%

\* H=αιμολυτικό, L=Λιπαιμικό, S = Δείγμα.



## Ensayo ELISA para anticuerpos anti LDL oxidadas (LDLox)

IVD

### PROSPECTO

REF 38085 ELISA para anticuerpos anti LDL oxidadas (LDLox) 96 análisis

#### USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos antilipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) en suero humano.

#### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos anti LDLox se asocian a condiciones clínicas tales como arteriosclerosis, estenosis carotídea y otras disfunciones de las arterias coronarias. Los anticuerpos anti LDLox pueden ser importantes también en otras enfermedades como la diabetes, la hipertensión y la endometriosis.<sup>1-5</sup>

La hipercolesterolemia está estrechamente asociada al aumento del riesgo de arteriosclerosis.<sup>4-6</sup> El colesterol acumulado en la placa arteriosclerótica deriva en primer lugar de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Actualmente, la oxidación de las LDL está reconocida como el evento desencadenante del proceso aterogénico.<sup>7</sup> Radicales libres como el superóxido y el óxido nítrico ( $-O_2$ , NO), que se generan en el cuerpo por reacciones biológicas, contribuyen a la oxidación de las LDL.<sup>8-9</sup> Se ha demostrado que el radical NO oxida la apolipoproteína B, un componente de las LDL. Del mismo modo, lipoxigenasas y oxidantes tales como el peroxinitrito pueden oxidar las porciones de lípidos en las LDL. Se ha demostrado que la LDLox y no la LDL nativa es eliminada por receptores de depuración presentes en monocitos, células del músculo liso y macrófagos de los vasos sanguíneos. La oxidación de LDL aumenta la afinidad de las LDLox con los receptores acetilo de macrófagos.<sup>10</sup> Dado que esta vía de captación de LDLox no está regulada, el resultado es la formación de macrófagos cargados de lípidos (células espumosas), fenómeno que constituye la primera etapa en la formación de la placa arteriosclerótica en los vasos sanguíneos. Luego, otras moléculas inflamatorias liberadas por los leucocitos aceleran el progreso de la placa arteriosclerótica.<sup>11,12</sup>

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra LDLox y sus complejos en el lupus eritematoso sistémico, la diabetes, la trombosis arterial, la hipertensión y otros trastornos.

#### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El análisis es un inmunoensayo en fase sólida. Los pocillos se recubren de antígeno LDLox; sigue una fase de bloqueo para reducir el ligado de proteínas no específicas durante el ciclo. Controles, calibradores y suero del paciente se incuban en los pocillos recubiertos de antígeno, permitiendo que los anticuerpos específicos presentes en la muestra se ligan al antígeno. Los anticuerpos no ligados y demás proteínas séricas se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos ligados se detectan añadiendo a los pocillos un conjugado de anti IgG humana marcada con enzima. Después de eliminar por lavado el conjugado que no se ha ligado, se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (TMB); la presencia de anticuerpos es revelada por el cambio de color producido por la conversión del sustrato TMB en un producto de reacción coloreado. Se detiene la reacción y se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, con espectrofotómetro a 450 nm. Los resultados se expresan en unidades ELISA por mililitro (UE/ml) y se clasifican como positivos o negativos.

#### REACTIVOS

##### Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.**

No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. Antes del uso, todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20-25 °C).



Reconstituya el tampón de lavado hasta el volumen de 1 litro con agua destilada o desionizada. Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Las tiras de pocillos recubiertos se utilizan una sola vez.

### Precauciones

Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCB). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse materiales potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales.<sup>13</sup>

**Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto.** No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen. Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y la contaminación cruzada de reactivos al manipularlos. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.









### Material suministrado

Zenit oxLDL ELISA [REF] 38085

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	MICROPLATE oxLDL	Microplaca con pocillos separables recubiertos de antígeno LDLox.
1 x 1,75 ml	CONTROL + oxLDL	<b>Control positivo</b> listo para usar ( <i>tapa roja</i> ). Contiene suero humano positivo a anticuerpos LDLox. En la etiqueta se indican los límites de concentración previstos expresados en UE/ml.
1 x 1,75 ml	CONTROL -	<b>Control negativo</b> listo para usar ( <i>tapa blanca</i> ). Contiene suero humano.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A oxLDL CALIBRATOR B oxLDL CALIBRATOR C oxLDL CALIBRATOR D oxLDL CALIBRATOR E oxLDL	<b>Conjunto de 5 calibradores</b> listos para usar. Derivado de suero humano con anticuerpos LDLox. Las concentraciones en UE/ml están impresas en las etiquetas. Calibrador A ( <i>tapa verde</i> ) 320 UE/ml; Calibrador B ( <i>tapa morada</i> ) 80 UE/ml; Calibrador C ( <i>tapa azul</i> ) 40 UE/ml; Calibrador D ( <i>tapa amarilla</i> ) 20 UE/ml, y Calibrador E ( <i>tapa naranja</i> ) 1 UE/ml.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugado HRP anti IgG humana de cabra listo para usar. Código de color rosado.
1 x 60 ml	DIL	Diluyente de suero listo para usar. Código de color verde.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Sustrato enzimático TMB listo para usar. <b>Protéjase de la luz.</b>
1 x 15 ml	STOP	Solución de interrupción lista para usar.
2 x	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. <b>Reconstituir cada unidad hasta un litro.</b>

### Símbolos utilizados en las etiquetas

	Número de lote
	Número de catálogo
	Para diagnóstico in vitro
	Fecha de caducidad
	Temperatura de conservación
	Léanse las instrucciones antes del uso
	Número de análisis
	Fabricante

### Materiales necesarios no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido
- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 450 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm
- Lavador automático de microplacas con capacidad de 200 µl

### RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

### PROCEDIMIENTO

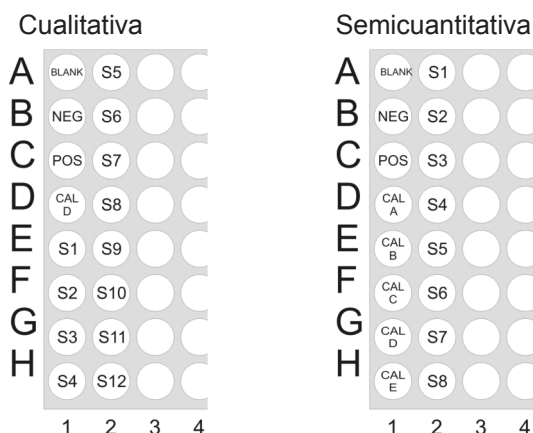
#### Advertencias preliminares

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Prepare todas las diluciones de muestras de pacientes antes de comenzar el análisis.
- Deje que las muestras y los reactivos se estabilicen a temperatura ambiente antes de usarlos. Se aconseja dejar los reactivos fuera de su caja durante 30 minutos antes del uso. Vuelva a poner inmediatamente en la nevera las muestras y reactivos no utilizados.
- Saque de la bolsa sólo las tiras de pocillos necesarias y cierre cuidadosamente la bolsa para evitar que se forme condensación en las tiras no utilizadas. Vuelva a poner inmediatamente la bolsa en la nevera.
- **Una buena técnica de lavado es crucial.** Si efectúa el lavado manualmente, debe rociar toda la microplaca con un fuerte chorro de solución de lavado, utilizando una botella de boca ancha. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**

- Utilice una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 ó 12 pocillos; de este modo, se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo en cada paso. El tiempo de incubación comienza al terminar de dispensar los reactivos.
- Las muestras y los reactivos se han de dispensar a la misma velocidad y en la misma secuencia.
- **La microplaca debe incubarse en la oscuridad. Esto se aplica tanto a la fase de incubación de muestras como de conjugado y sustrato. La exposición a la luz durante la incubación podría alterar los resultados.**

### Procedimiento del ensayo

- Paso 1** Deje que los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente.
- Paso 2** Marque en la hoja de protocolo la posición de la muestra en la microplaca; es buena norma de laboratorio analizar las muestras por duplicado.
- Paso 3** **Determinación cualitativa:** use únicamente el Calibrador D (*frasco de tapa amarilla*). En cambio, para la **determinación semicuantitativa** use los calibradores de A a E, ya listos para usar, como se muestra en el esquema siguiente.



- Paso 4** Prepare una dilución de **1:101** de la muestra del paciente, mezclando **5 µl** de suero del paciente con **500 µl** de diluyente de suero.
- Paso 5** Saque de la bolsa los pocillos necesarios; guarde las tiras no utilizadas en su bolsa hermética y póngalas en la nevera. Coloque los pocillos en el soporte suplementario.
- Paso 6** Dispense **100 µl** de calibradores, de controles positivo y negativo y de muestras diluidas de pacientes (1:101) en los correspondientes pocillos, según las indicaciones de la hoja de protocolo.  
**Nota:** Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga en cero el lector ELISA frente al blanco de reactivo.
- Paso 7** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min.) a temperatura ambiente y a oscuras.
- Paso 8** Lave **4 veces** con el tampón de lavado. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Elimine el contenido aspirando el líquido de los pocillos o bien invirtiéndolos y sacudiéndolos. Para secar los pocillos después del último lavado, ponga las tiras boca abajo y sacúdalas enérgicamente sobre papel absorbente. Si utiliza un lavador automático, prográmelo siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Dispense **100 µl** de conjugado en los pocillos.
- Paso 10** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min.) a temperatura ambiente y a oscuras.
- Paso 11** Lave los pocillos como se indica en el paso 8.
- Paso 12** Dispense **100 µl** de sustrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.



- Paso 13** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente y a oscuras.
- Paso 14** Dispense **100  $\mu$ l** de solución de interrupción en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el sustrato enzimático. Lea los valores de absorbancia dentro de la siguiente hora.
- Paso 15** Lea la absorbancia de cada pocillo con un lector de microplacas a **450 nm**, o bien a 450/630 si utiliza un lector de microplacas de doble longitud de onda, frente al blanco de reactivo ajustado en absorbancia cero.

### Control de calidad

En cada ciclo deben incluirse los calibradores, los controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para verificar la integridad y exactitud del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo debe ser  $<0,3$ . La lectura de absorbancia del calibrador A no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario, es necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser  $<20$  UE/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, para determinar las UE/ml debe tomarse el valor promedio de ambas lecturas. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la densidad óptica del calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semicuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

## RESULTADOS

### Cálculo

Para determinar las concentraciones de las muestras pueden aplicarse dos métodos:

#### 1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Absorbancia de muestra analizada  
 ----- X UE/ml de calibrador D = UE/ml muestra analizada  
 Absorbancia de calibrador D

#### 2. DETERMINATION SEMICUANTITATIVA

En papel lin-log, trace la absorbancia de los calibradores de A a E contra sus respectivas concentraciones. Marque las concentraciones expresadas en UE/ml en el eje X, y las lecturas de absorbancia en el eje Y. Trace una curva punto/punto. Determine las concentraciones de las muestras del paciente según la curva comparándola con sus correspondientes valores de absorbancia. En alternativa, puede utilizar una curva de cuatro parámetros para trazar la curva estándar.

### Calibradores

Los calibradores proporcionan la semicuantificación y deben utilizarse en cada ensayo. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del calibrador A. Para determinar con precisión los valores semicuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las UE/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

### Interpretación

Los valores de interpretación se determinaron analizando sangre de 64 donantes adultos sanos. Como valor umbral se tomó la media de los individuos normales más 2 DE y se le asignó el valor arbitrario de 20 UE/ml. A. Menarini Diagnostics aconseja utilizar los valores de referencia que se dan a continuación. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales, que podrán variar según la población examinada.

Valor antic. LDLox	Interpretación
$< 20$ UE/ml	Negativo
20-25 UE/ml	Incierto (valores límite)
$>25$ UE/ml	Positivo

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

Los resultados obtenidos con este análisis no deben interpretarse como un diagnóstico por sí solos, sino que se han de evaluar junto con el examen clínico del paciente. Los resultados inciertos se han de analizar

otra vez para confirmar el resultado. Es aconsejable que pacientes con estas características repitan el análisis a intervalos adecuados.

## VALORES ESPERADOS

En una población sana, los resultados del análisis deberían ser negativos. Los pacientes con arteriosclerosis, diabetes, LES y trastornos inducidos por estrés presentan anticuerpos anti-LDL.

## CARACTERÍSTICA DE RENDIMIENTO

A. Asociación de enfermedades: el ensayo Zenit oxLDL ELISA para anticuerpos anti LDL oxidadas se evaluó analizando suero de pacientes con condiciones asociadas como se informa en la literatura, sueros de control de pacientes con enfermedades autoinmunes no asociadas, y sueros de control de individuos sanos. Los resultados de estos análisis y el número de muestras de suero tomadas de cada categoría se resumen a continuación:

<b>Categoría</b>	<b>n</b>	<b>Núm. pos. anticuerpos oxLDL (%)</b>
Enfermedad de arterias coronarias	9	7 (78%)
Positivos a anticuerpos fosfolípidos	57	33 (58%)
Controles de enfermedad	50	1 (2%)
Sanos	100	4 (4%)

B. Reactividad cruzada: mediante el sistema Zenit oxLDL se analizó un total de 50 muestras con potencial reactividad cruzada de individuos con otros trastornos autoinmunes o positivos a otros autoanticuerpos.

<b>Condición</b>	<b>n</b>	<b>núm. positivo a anticuerpos oxLDL (%)</b>
Positivo ac. antinucleares	10	0 (0%)
Positivo ac. péptidos cíclicos citrulinados	10	0 (0%)
Enfermedad de Hashimoto	10	0 (0%)
Positivo ac. Hsp-70	10	0 (0%)
Positivo factor reumatoide	10	1 (10%)
Total	50	1 (2%)

## Precisión

La precisión entre ensayos se analizó con 3 muestras positivas seleccionadas dentro de los límites del ensayo. Se efectuaron ciclos de ensayos múltiples en momentos diferentes. La precisión dentro del análisis se calculó sobre la base de 10 repeticiones de 3 muestras, y luego se calculó el coeficiente de variación (CV). El CV entre ensayos y dentro del ensayo osciló entre el 5 y el 13%.

## Linealidad

Para determinar la linealidad aceptable, se analizaron los pocillos con calibradores de valores conocidos. Los valores cuadráticos de las curvas estándar resultantes se determinaron para ensayos múltiples. Un valor

cuadrático superior a 0,95 se considera aceptable. El valor cuadrático promedio de estos ensayos en los análisis de precisión fue de 0,9977 y ningún valor fue inferior a 0,9972.

### Recuperación

Muestras con concentraciones conocidas de anticuerpos LDLox se mezclaron con las diluciones apropiadas de otras muestras positivas con concentración conocida de anticuerpos LDLox. Se determinaron las concentraciones de anticuerpos de las muestras mezcladas y a partir de los valores obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación. Los resultados fueron los siguientes:

Muestras	M1 (UE/ml)	M2 (UE/ml)	UE/ml esperadas	UE/ml obtenidas	% recuperación (obtenido/esperado)
Mezcla 1	43,6	42,2	42,9	49,4	115,2%
Mezcla 2	37,1	60,2	48,6	50,4	103,6%
Mezcla 3	20,1	52,9	36,5	38,0	104,0%
Mezcla 4	78,9	65,3	72,1	84,3	116,9%
Mezcla 5	178,5	152,8	165,7	171,3	103,4%

### Interferencia

La interferencia se estudió mezclando sueros con concentraciones conocidas de anticuerpos anti LDLox con muestras de sueros potencialmente interferentes y estudiando la desviación con respecto a los resultados esperados. Los resultados fueron los siguientes:

Mezcla*	M1 (UE/ml)	M2 (UE/ml)	UE/ml esperadas	UE/ml obtenidas	% interferencia
H1	24,0	19,1	21,6	24,1	111,8%
L1	24,0	14,0	19,0	19,9	104,9%
H2	42,3	19,1	30,7	26,8	87,2%
L2	42,3	14,0	28,1	24,0	85,4%
H3	79,3	21,5	50,4	48,3	95,9%
L3	79,3	18,6	48,9	48,9	99,9%
H4	189,8	12,2	101,0	131,8	130,5%
L4	189,8	2,1	95,9	117,1	122,1%
H5	167,9	24,6	96,3	101,3	105,3%
L5	167,9	11,6	89,8	104,1	115,9%

\* H=hemolizada, L=lipémica.



# ELISA für Antikörper gegen oxidiertes LDL (oxLDL)

IVD

## BEIPACKTEXT

REF 38085 ELISA für Antikörper gegen oxidiertes LDL (oxLDL) 96 Bestimmungen

### VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für die qualitative und semi-quantitative Bestimmung von oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL) in Humanserum.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antikörper gegen oxidiertes LDL stehen mit gewissen Krankheitsbildern wie Atherosklerose, Karotisstenose und anderen Störungen der Koronararterien in Verbindung. Antikörper gegen oxidiertes LDL können auch bei anderen Krankheiten, z.B. Diabetes, Hypertonie und Endometriose, von Bedeutung sein.<sup>1-5</sup>

Hypercholesterinämie ist eng mit einem erhöhten Risiko für Atherosklerose verbunden.<sup>4,6</sup> Das in der atherosklerotischen Plaque angehäuften Cholesterin stammt hauptsächlich von Low Density Lipoprotein (LDL). Die Oxidierung von LDL wird als kritisches Ereignis im atherogenen Vorgang akzeptiert.<sup>7</sup> Freie Radikale, wie Superoxid und Stickoxid ( $-O_2$ , NO), die in biologischen Reaktionen im Körper gebildet werden, tragen zur Oxidierung von LDL bei.<sup>8,9</sup> Es wurde gezeigt, dass das NO-Radikal Apolipoprotein B, einen Bestandteil von LDL, oxidiert. Auf ähnliche Weise können Lipoxygenasen und Oxidantien wie Peroxynitrit die Lipid-Anteile in LDL oxidieren. Es wurde nachgewiesen, dass oxidiertes LDL, und nicht natives LDL, durch Scavenger-Rezeptoren auf den Monozyten, den glatten Muskelzellen und den Makrophagen in den Blutgefäßen aufgenommen wird. Die Oxidierung von LDL erhöht die Affinität von oxidiertem LDL zu den Acetylrezeptoren der Makrophagen.<sup>10</sup> Da dieser Aufnahmeweg von oxidiertem LDL unreguliert ist, führt er zur Bildung von lipidbeladenen Makrophagen (Schaumzellen). Das Vorliegen von Schaumzellen ist der erste Schritt bei der Bildung von atherosklerotischer Plaque in den Blutgefäßen. Später fördern andere, von den Leukozyten freigegebene entzündliche Moleküle den Verlauf der atherosklerotischen Plaque.<sup>11,12</sup>

Antikörper gegen oxLDL und seine Verbindungen wurden bei systemischem Lupus erythematoses, Diabetes, arterieller Thrombose, Hypertonie usw. nachgewiesen.

### TESTPRINZIP

Der Test wird als Festphasenimmuntest durchgeführt. Die Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit oxLDL-Antigen beschichtet. Es folgt ein Blockierungsschritt, um die unspezifische Proteinbindung während des Testlaufs zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibratoren und Patientenseren werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert, um die Bindung der spezifischen Antikörper in den Proben an das Antigen zu ermöglichen. Ungebundene Antikörper und andere Serumeiweiße werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-IgG-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (TMB) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorliegen von Antikörpern wird mittels einer Farbveränderung nachgewiesen, die durch die Umwandlung des TMB-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 450 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) ausgedrückt und als positiv oder negativ angegeben.

### REAGENZIEN

#### Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.**

Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.

Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

### Vorsichtsmaßnahmen

Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis.<sup>13</sup>

**Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen.** Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Materialien aus anderen Quellen aus. Befolgen Sie die Regeln der Guten Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien deren mikrobielle Verunreinigung und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Die Kitbestandteile nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

### Mitgelieferte Materialien








Zenit oxLDL-ELISA [REF] 38085

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von 96 Bestimmungen.

12 x 8	MICROPLATE oxLDL	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen. Mit oxLDL-Antigen beschichtet. Gebrauchsfertig.
1 x 1,75 ml	CONTROL + oxLDL	Gebrauchsfertige <b>Positivkontrolle</b> ( <i>rote Kappe</i> ). Enthält oxLDL-Antikörper-positives Humanserum. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett angegeben.
1 x 1,75 ml	CONTROL -	Gebrauchsfertige <b>Negativkontrolle</b> ( <i>weiße Kappe</i> ). Enthält Humanserum.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A oxLDL CALIBRATOR B oxLDL CALIBRATOR C oxLDL CALIBRATOR D oxLDL CALIBRATOR E oxLDL	Gebrauchsfertiges <b>Set mit 5 Kalibratoren</b> . Aus Humanserum mit oxLDL-Antikörpern hergestellt. Die Konzentrationen in EU/ml sind auf dem Etikett angegeben. Kalibrator A ( <i>grüne Kappe</i> ) 320 EU/ml; Kalibrator B ( <i>lila Kappe</i> ) 80 EU/ml; Kalibrator C ( <i>blaue Kappe</i> ) 40 EU/ml; Kalibrator D ( <i>gelbe Kappe</i> ) 20 EU/ml und Kalibrator E ( <i>orange Kappe</i> ) 1 EU/ml.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP-Ziegen-anti-human-IgG. Gebrauchsfertig. Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	DIL	Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig. Farbkennzeichnung grün.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	TMB-Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig. <b>Vor Licht schützen.</b>
1 x 15 ml	STOP	Stopplösung. Gebrauchsfertig.
2 x	BUF WASH	Waschpuffer in Pulverform. <b>Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.</b>




**Auf den Etiketten verwendete Symbole:**

- |   |                          |
|---|--------------------------|
|  | Chargennummer            |
|  | Bestellnummer            |
|  | In-vitro-Diagnostikum    |
|  | Verwendbar bis           |
|  | Lagerungstemperatur      |
|  | Gebrauchsanleitung lesen |
|  | Anzahl an Tests          |
|  | Hersteller               |

**Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien**

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschlösungspuffer
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 450 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

**PROBENTNAHME UND -HANDHABUNG**

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

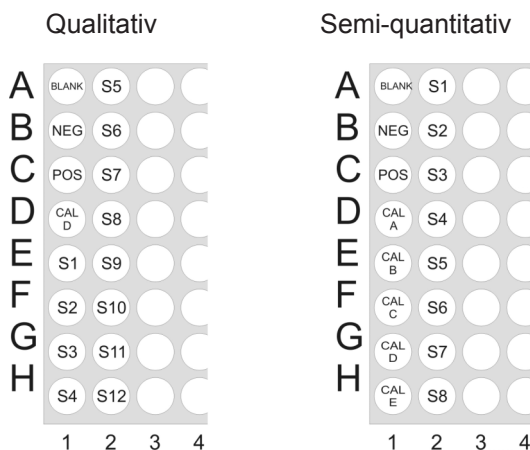
**VERFAHREN**
**Hinweise zum Verfahren**

- Lesen Sie sorgfältig den Beipacktext, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens, bis die Patientenproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht haben. Es wird empfohlen, die Reagenzien 30 Minuten vor der Anwendung aus der Verpackung zu nehmen und auf dem Arbeitstisch stehen zu lassen. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.
- **Eine gute Waschmethode ist unerlässlich.** Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschlösungspuffer über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**

- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 oder 12 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.
- **Stellen Sie sicher, dass die Inkubation der Mikrotiterplatten im Dunkeln stattfindet. Dies gilt für die Inkubationsschritte von Probe, Konjugat und Substrat. Lichteinwirkung während der Inkubation kann die Ergebnisse beeinträchtigen.**

### Testmethode

- Schritt 1** Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.
- Schritt 2** Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.
- Schritt 3** Verwenden Sie für die **qualitative Bestimmung** nur Kalibrator D (*gelbe Kappe*).  
 oder  
 Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die Kalibratoren A bis E, wie in der Probenanordnung unten angezeigt.



- Schritt 4** Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **500 µl** Serumverdünnungsmittel vermischen.
- Schritt 5** Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Vertiefungen sicher in den mitgelieferten Halter ein.
- Schritt 6** Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, der Positiv- und Negativkontrollen und der verdünnten Patientenproben (**1:101**) in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.  
**Anmerkung:** Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünnungsmittel als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null.
- Schritt 7** Inkubieren Sie **30 Minuten** ( $\pm 5$  min) im Dunkeln bei Raumtemperatur.
- Schritt 8** Waschen Sie **4-mal** mit Waschpuffer. Füllen Sie zum manuellen Waschen jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier

kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

- Schritt 9** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 10** Inkubieren Sie **30 Minuten** ( $\pm 5$  min) im Dunkeln bei Raumtemperatur.
- Schritt 11** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.
- Schritt 12** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 13** Inkubieren Sie **30 Minuten** ( $\pm 5$  min) im Dunkeln bei Raumtemperatur.
- Schritt 14** Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie den Extinktionswert innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.
- Schritt 15** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **450 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 450/630 nm.

### Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte  $<0,3$  sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert der Negativkontrolle muss  $<20$  EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die EU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die der Negativkontrolle und kleiner als die Extinktion der Positivkontrolle sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte der Positivkontrolle innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereiches liegen.

## ERGEBNISSE

### Berechnungen

Die Konzentrationen der Proben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

#### 1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Ext. der Testprobe

----- X EU/ml von Kalibrator D = = EU/ml der Testprobe

Ext. von Kalibrator D

#### 2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf lin-log-Koordinatenpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis E gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentrationen in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie eine passende Kurve von Punkt zu Punkt. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte. Alternativ kann eine Vier-Parameter-Kurve zum Erstellen der Standardkurve verwendet werden.

### Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte zu bestimmen, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereiches der Kalibratorkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

## Interpretation

Die Interpretationswerte wurden bestimmt, indem 64 normale erwachsene Blutspender getestet wurden. Der Durchschnitt der normalen Testpersonen plus 2 SD wurde als Grenzwert des Tests festgelegt; ihm wurde der willkürliche Wert von 20 EU/ml zugeordnet. A. Menarini Diagnostics empfiehlt die Anwendung des unten angegebenen Referenzbereiches. Jedes Labor sollte die Testwerte für seine eigenen Umstände validieren.

oxLDL-AK-Wert	Interpretation
< 20 EU/ml	Negativ
20-25 EU/ml	Unbestimmt (Grenzbereich)
> 25 EU/ml	Positiv

## EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

Die mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse sind nicht allein diagnostisch und sollten im Zusammenhang mit dem klinischen Bild des Patienten betrachtet werden. Patienten mit Grenzwerten sollten erneut getestet werden, um das Ergebnis zu bestätigen. Es wird außerdem empfohlen, Patienten mit Ergebnissen im Grenzbereich in angemessenen Abständen erneut zu testen.

## ERWARTETE WERTE

Bei einer normalen Population werden negative Testergebnisse erwartet. Antikörper gegen oxidiertes LDL liegen bei Patienten mit Atherosklerose, Diabetes, SLE und stressinduzierbarer Erkrankung vor.

## Leistungsmerkmale

A. Krankheitszusammenhang: Der Zenit oxLDL-Antikörper-ELISA für den Nachweis von Antikörpern gegen oxidiertes LDL wurde bewertet, indem Seren von Patienten mit verbundenen Krankheiten (wie in der Literatur berichtet), Krankheitskontrollseren von Patienten mit nicht verbundenen Autoimmunkrankheiten und Kontrollseren von gesunden, normalen Testpersonen getestet wurden. Die Ergebnisse dieser Tests und die Anzahl der Seren aus jeder Population sind nachfolgend zusammengefasst.

Population	N	oxLDL-AK-pos. N (%)
Koronare Herzkrankheit	9	7 (78%)
Phospholipid-AK-positiv	57	33 (58%)
Krankheitskontrollen	50	1 (2%)
Normal	100	4 (4%)

B. Kreuzreaktivität: Insgesamt 50 potentiell kreuzreaktive Proben von Patienten mit anderen Autoimmunkrankheiten oder positiven Ergebnissen für andere Autoantikörper wurden mit dem Zenit oxLDL-System auf oxLDL-Antikörper getestet.

Krankheit	N	oxLDL-AK-positiv N (%)
positiv für antinukleäre AK	10	0 (0%)
pos. für AK gegen zyklische citrullinierte Peptide	10	0 (0%)
Hashimoto-Krankheit	10	0 (0%)
Hsp-70-AK-positiv	10	0 (0%)
Rheumafaktor-positiv	10	1 (10%)
Gesamt	50	1 (2%)

## Präzision

Die interserielle Präzision wurde mit 3 positiven Proben getestet, die aus dem gesamten Testbereich ausgewählt wurden. Mehrfache Testläufe wurden zu verschiedenen Zeiten durchgeführt. Die intraserielle Präzision wurde auf der Grundlage von 10 Wiederholungen von 3 Proben berechnet. Auf der Grundlage dieser Wiederholungen wurde der Variationskoeffizient (VK) berechnet. Der interserielle VK und der intraserielle VK lagen bei 5-13 %.

## Linearität

Um die akzeptable Linearität zu bestimmen, wurden Platten mit Kalibratoren mit bekannten Werten getestet. Die  $r^2$ -Werte der resultierenden Standardkurven wurden für mehrere Tests bestimmt. Ein  $r^2$ -Wert über 0,95 wird als akzeptabel angesehen. Der durchschnittliche  $r^2$ -Wert für diese Tests im Rahmen der Präzisionstests war 0,9977, wobei kein einzelner Wert unter 0,9972 lag.

## Wiederfindung

Proben mit bekannten Konzentrationen von oxLDL-Antikörpern wurden mit geeigneten Verdünnungen anderer positiver Proben mit bekannten Mengen an oxLDL-Antikörpern gemischt. Die Antikörperspiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und zur Berechnung der Wiederfindung in Prozent verwendet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Proben	P1 (EU/ml)	P2 (EU/ml)	EU/ml Erwartet	EU/ml Erhalten	% Wiederfindung (Erhalten/Erwartet)
Mischung 1	43,6	42,2	42,9	49,4	115,2 %
Mischung 2	37,1	60,2	48,6	50,4	103,6 %
Mischung 3	20,1	52,9	36,5	38,0	104,0 %
Mischung 4	78,9	65,3	72,1	84,3	116,9 %
Mischung 5	178,5	152,8	165,7	171,3	103,4 %

## Interferenz

Die Interferenz wurde untersucht, indem Seren mit bekannten oxLDL-Antikörperkonzentrationen mit potentiell interferierenden Serumproben gemischt wurden und die Abweichung von den erwarteten Werten untersucht wurde. Die Ergebnisse sind nachfolgend angezeigt.

Mischung*	P1 (EU/ml)	P2 (EU/ml)	EU/ml Erwartet	EU/ml Erhalten	% Interferenz
H1	24,0	19,1	21,6	24,1	111,8 %
L1	24,0	14,0	19,0	19,9	104,9 %
H2	42,3	19,1	30,7	26,8	87,2 %
L2	42,3	14,0	28,1	24,0	85,4 %
H3	79,3	21,5	50,4	48,3	95,9 %
L3	79,3	18,6	48,9	48,9	99,9 %
H4	189,8	12,2	101,0	131,8	130,5 %
L4	189,8	2,1	95,9	117,1	122,1 %
H5	167,9	24,6	96,3	101,3	105,3 %
L5	167,9	11,6	89,8	104,1	115,9 %

\* H = hämolytisch, L = lipämisch



# ELISA Anticorps LDL Oxydé (oxLDL)

IVD

## ENCART DU PRODUIT

REF 38085 ELISA Anticorps LDL oxydé (oxLDL) 96 Déterminations

### UTILISATION PREVUE

Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection qualitative et semi-quantitative des anticorps à la lipoprotéine à basse densité oxydée (oxLDL) dans le sérum humain.

### GENERALITES

Les anticorps anti-LDL oxydée sont associés à certaines conditions cliniques telles que l'artériosclérose, la sténose carotidienne et d'autres problèmes des artères coronariennes. Les anticorps anti-LDL oxydé peuvent aussi être importants dans des maladies telles que le diabète, l'hypertension et l'endométriose.<sup>1-5</sup>

L'hypercholestérolémie est étroitement associée à une augmentation du risque d'artériosclérose.<sup>4,6</sup> Le cholestérol accumulé dans les plaques d'athéromes est dérivé principalement des lipoprotéines de basse densité (LDL). L'oxydation du LDL est considérée comme un événement critique dans les processus athérogéniques.<sup>7</sup> Les radicaux libres tels que l'oxyde et le superoxyde nitrique ( $-O_2$ , NO) créés lors des réactions biologiques dans le corps contribuent à l'oxydation du LDL.<sup>8,9</sup> On a démontré que le radical NO oxyde l'apolipoprotéine B, un constituant du LDL. De façon similaire, les lipo-oxygénases et les oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène peuvent oxyder le groupe des lipides dans le LDL. On a démontré que le LDL oxydé et le LDL non natif sont pris en charge par les récepteurs charognards sur les monocytes, les cellules des muscles lisses et les macrophages dans les vaisseaux sanguins. L'oxydation du LDL augmente l'affinité du LDL oxydé pour les récepteurs acétyl des macrophages.<sup>10</sup> Comme ce chemin du LDL oxydé n'est pas régulé, cela entraîne la formation de macrophages chargés de lipides (cellules mousse). La présence de cellules mousse est la première étape dans la formation de plaques d'athéromes dans les vaisseaux sanguins. Plus tard, d'autres molécules inflammatoires relâchées par les leucocytes participent à la progression de la plaque d'athérome.<sup>11,12</sup>

Les anticorps contre le oxLDL et ses complexes on été retrouvés dans le lupus érythémateux systémique, le diabète, la thrombose artérielle, l'hypertension, etc.

### PRINCIPES DU TEST

Le test est réalisé comme un test immunologique en phase solide. Les micro-puits sont recouverts avec l'antigène oxLDL suivi par une procédure de blocage pour réduire les liaisons non-spécifiques durant le déroulement du test. Les contrôles, les étalons et les sérums de patients dilués sont ajoutés dans différents puits, autorisant chaque anticorps présent à se lier à l'antigène en place. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage des micro-puits. Un conjugué enzymatique anti-IgG humaine est alors ajouté dans chaque puit pour révéler les anticorps du patient. Le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'enzyme spécifique au substrat (TMB) est ensuite ajoutée aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur lors de la conversion du substrat TMB en un produit de réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnel à la concentration de l'anticorps, sera déterminée par lecture au spectrophotomètre à 450 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA par millilitres (EU/ml) et reportés comme positifs ou négatifs.

### REACTIFS

#### Conservation et préparation

Conservé tous les réactifs entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas employer le réactif s'il est trouble ou si un précipité s'est formé. Tous les réactifs doivent être portés à la température ambiante (20-25°C) avant de les utiliser.

Reconstituer le tampon de lavage en y ajoutant de l'eau distillée ou déionisée pour un volume de 1 L. Conservé entre 2 et 8°C, le tampon de lavage est stable jusqu'à la date limite d'utilisation du kit. Les micro-puits ne peuvent être utilisés qu'une seule fois.

### Précautions

Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes HBsAg, HCV, HIV-1 et 2 et HTLV-I. Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage<sup>24</sup>.

**Les instructions doivent être suivies exactement comme elles apparaissent dans cette notice de kit pour assurer des résultats valides.** Ne pas interchanger les composants du kit avec ceux provenant d'autres sources. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire pour minimiser la contamination microbienne et croisée lors de la manipulation. Ne pas utiliser les composants du kit après la date de péremption figurant sur les étiquettes.









### Matériel fourni

Zenit oxLDL ELISA [REF] 38085

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 déterminations.

12 x 8	[MICROPLATE oxLDL]	Microlamelle avec micro-puits individuels. Recouverts d'antigène oxLDL. Prêt à l'emploi.
1 x 1.75 ml	[CONTROL + oxLDL]	<b>Contrôle Positif</b> prêt à l'emploi ( <i>couvercle rouge</i> ). Contient sérum humain positif pour anticorps oxLDL. La gamme de valeurs attendues en EU/ml se trouve sur l'étiquette du flacon.
1 x 1.75 ml	[CONTROL -]	<b>Contrôle négatif</b> ( <i>couvercle blanc</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
5 x 1.75 ml	[CALIBRATOR A oxLDL] [CALIBRATOR B oxLDL] [CALIBRATOR C oxLDL] [CALIBRATOR D oxLDL] [CALIBRATOR E oxLDL]	<b>Set de 5 Etalons</b> prêt à l'emploi Dérivé de sérum humain contenant des anticorps oxLDL. Les concentrations en EU/ml se trouvent sur les étiquettes. Etalon A ( <i>couvercle vert</i> ) 320 EU/ml; Etalon B ( <i>couvercle violet</i> ) 80 EU/ml; Etalon C ( <i>couvercle bleu</i> ) 40 EU/ml; Etalon D ( <i>couvercle jaune</i> ) 20 EU/ml, et Etalon E ( <i>couvercle orange</i> ) 1 EU/ml.
1 x 15 ml	[IgG-CONJ HRP]	Conjugué HRP de chèvre anti-IgG humaine. Prêt à l'emploi.
1 x 60 ml	[DIL]	Diluant sérum. Prêt à l'emploi. Code couleur pourpre.
1 x 15 ml	[SUBSTRATE TMB]	Substrat enzyme TMB. Prêt à l'emploi. <b>Protéger de la lumière.</b>
1 x 15 ml	[STOP]	Solution d'Arrêt. Prêt à l'emploi.
2 x	[BUF WASH]	Tampon de lavage en poudre. <b>Reconstituer pour 1 litre.</b>

### Symboles utilisés sur les étiquettes

	Numéro de lot
	Référence catalogue
	Pour usage diagnostique In vitro
	A utiliser avant
	Température de conservation
	Lire les instructions avant utilisation
	Nombre de tests
	Fabricant

### Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou déionisée
- Bouteille pour le tampon de lavage
- Pipettes capables de délivrer de 5 à 1000 µl
- Bouts de pipette jetables
- Petits tubes de 12 X 75 mm et porte-tubes
- Timer
- Papier absorbant
- Lecteur de microlamelles pouvant lire les valeurs d'absorbance à 450 nm. Si la longueur d'onde double est disponible, le filtre de référence sera de 600-650 nm.
- Bac pour le lavage automatique capable de dispenser 200 µl

### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, les sérums doivent être congelés. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

### METHODE

#### Préparation du test

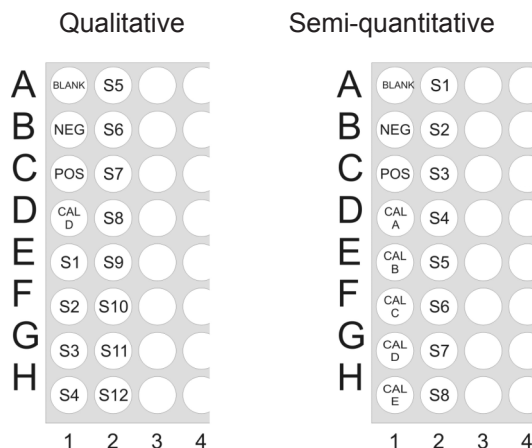
- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante avant de commencer la procédure. Il est conseillé de laisser les réactifs hors de la boîte pendant 30 minutes avant de les utiliser. Replacer les produits non utilisés au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Enlever les microlamelles nécessaires du récipient et refermer soigneusement le récipient pour éviter la condensation dans les puits non utilisés. Replacer immédiatement le récipient au réfrigérateur.
- **Une bonne technique de lavage est essentielle.** Si l'opération est réalisée manuellement, diriger un jet puissant de vapeur de tampon de lavage à l'aide d'une large bouteille sur toute la surface de la microlamelle. **Il est recommandé d'utiliser un bac de lavage des microlamelles automatique.**
- Utiliser une pipette multicanaux capable de remplir 8 ou 12 puits simultanément. Ceci rend le processus plus rapide et fournit un temps d'incubation plus uniforme.



- Pour toutes les étapes, la synchronisation est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution des réactifs.
- L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit être réalisé à la même cadence et selon la même séquence.
- **S'assurer que les incubations des microlamelles se fassent dans l'obscurité. Ceci comprend les étapes d'incubation des échantillons, du conjugué et du substrat. L'exposition à la lumière durant l'incubation peut modifier les résultats.**

### Exécution du test

- Etape 1** Porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante.
- Etape 2** Indiquer sur une feuille du protocole la position des échantillons sur la microlamelle. Il est de bonne pratique de vérifier les échantillons en double.
- Etape 3** **Détermination qualitative** : employer uniquement l'étalon D (*couvercle jaune*).  
 ou  
**Détermination semi-quantitative** : employer les étalons A à E comme montré dans l'exemple ci-dessous.



- Etape 4** Préparer une dilution de **1:101** de l'échantillon patient en mélangeant **5 µl** de l'échantillon patient à **500 µl** de diluant pour échantillons.
- Etape 5** Prélever les microlamelles nécessaires du récipient et replacer les tiges non utilisées dans le récipient fermé au réfrigérateur. Placer soigneusement les microlamelles dans le porte-lamelles fourni.
- Etape 6** Pipeter **100 µl** des étalons prêts à l'emploi, des échantillons de patients dilués (**1:101**), des contrôles négatif et positif dans les puits indiqués sur la feuille de protocole.  
**Note** : Inclure un puit avec **100 µl** de diluant pour échantillons comme blanc de réactif. La lecture ELISA de ce blanc sera zéro.
- Etape 7** Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante à l'obscurité.
- Etape 8** Laver **4 x** avec le tampon de lavage: aspirer soigneusement le contenu de chaque puit. Ajouter le tampon reconstitué dans tous les puits et aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant pour enlever tout liquide de lavage résiduel. En cas d'utilisation de bacs de lavage automatiques, programmer l'appareil comme indiqué sur la notice d'utilisation.
- Etape 9** Pipeter **100 µl** de conjugué dans chaque puit.
- Etape 10** Incuber pendant **30 minutes** (+- 5 min.) à température ambiante à l'obscurité.
- Etape 11** Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 8.



- Etape 12** Pipeter **100 µl** de substrat enzymatique dans chaque puit dans le même ordre et timing que le conjugué.
- Etape 13** Incuber **30 minutes** (+- 5 min.) à température ambiante à l'obscurité.
- Etape 14** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puit. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire les valeurs d'absorbance dans les **30 minutes** qui suivent l'arrêt de la réaction.
- Etape 15** Lire l'absorption de chaque puit à **450nm** en utilisant un lecteur simple ou à longueur d'onde double 450/630 nm en prenant le blanc de réactif comme zéro d'absorbance.

### Contrôle qualité

Les étalons, les contrôles positifs et négatifs et un blanc doivent être présents dans chaque série de test pour garantir l'intégrité et la précision de ce dernier. La lecture de densité optique du blanc doit être inférieure à 0.3. L'étalon A doit avoir une lecture de densité optique supérieure à 1.0, sinon le test doit être répété. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est réalisé en double, prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer les concentrations en EU/ml. Lors des déterminations qualitatives, la densité optique de l'étalon D doit être plus grande que celle du contrôle négatif et plus petite que celle du contrôle positif. Pour les déterminations semi-quantitatives, le contrôle positif doit donner des valeurs dans les fourchettes figurant sur le flacon.

## RESULTATS

### Calcul

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

#### 1. DETERMINATION QUALITATIVE

Abs. Echantillon

----- X EU/ml étalon D = EU/ml Echantillon

Abs. Etalon D

#### 2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Tracer l'absorbance des étalons A à E par rapport à leur concentration respective sur un graphique linéaire. Tracer la concentration en EU / ml sur l'axe des X et l'absorbance sur l'axe Y et dessiner la courbe la plus proche. Déterminer les concentrations des échantillons patients provenant de la courbe par leurs valeurs correspondantes d'absorbance. En alternative, une courbe à quatre paramètres peut être utilisée pour tracer la courbe standard.

### Etalons

Les étalons sont fournis pour une détermination semi-quantitative et doivent être employés lors de chaque test. Les échantillons patients contenant les niveaux les plus élevés d'anticorps peuvent donner des valeurs d'absorbance plus grandes que celles de l'Etalon A. Pour la détermination des valeurs semi-quantitatives précises de tels échantillons, il faut les diluer et les tester à nouveau jusqu'à ce que les résultats puissent être lus sur la courbe d'étalonnage. Pour la détermination en EU / ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

### Interprétation

Les valeurs d'interprétation ont été déterminées en testant 64 donneurs adultes normaux. La moyenne des sujets normaux plus 2 DS a été établie comme la limite de test et on a assigné une valeur arbitraire de 20 EU/ml. A. Menarini Diagnostics suggère l'utilisation de la gamme de référence ci-dessous. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

valeur Ab oxLDL	Interprétation
<20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	Indéterminé (Limite)
>25 EU/ml	Positif

## LIMITES D'UTILISATION

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, les sérums doivent être congelés. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

Les résultats obtenus servent seulement d'aide dans le diagnostic et doivent être considérés en association avec d'autres informations de laboratoire ou cliniques. Tout résultat de patient limite devrait être testé à nouveau pour confirmer le résultat. Il est aussi recommandé que les patients avec des résultats limite soient testés à nouveau à des intervalles appropriés.

## VALEURS ATTENDUES

Les valeurs prévues dans une population normale sont négatives. Les anticorps LDL oxydé se retrouvent chez les patients avec artériosclérose, diabète, SLE et des troubles liés au stress.

## CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

A. Association de maladie: Le test Zenit Anticorps oxLDL ELISA pour la détection des anticorps LDL oxydé a été évalué en testant des sérums de patients avec les conditions associées tel que reporté dans la littérature, sérums de contrôle maladie de patients avec maladies auto-immunitaires non associées et sérums de contrôle de sujets normaux sains. Les résultats de ces tests sont résumés ci-dessous pour chaque population.

Population	n	Ab Pos oxLDL n (%)
Maladie Artères Coronariennes	9	7 (78%)
Positif Anticorps Phospholipide	57	33 (58%)
Contrôles de maladie	50	1 (2%)
Normaux	100	4 (4%)

B. Réactivité croisée: Un total de 50 échantillons à la réactivité croisée potentielle provenant d'individus avec d'autres désordres auto-immunitaires ou positifs pour d'autres auto-anticorps ont été testés pour les anticorps oxLDL en utilisant le système Zenit oxLDL.

Condition	n	Ab positive oxLDL n (%)
Ab positive Antinucléaire	10	0 (0%)
Ab positive Peptide Cyclique Citrulinidé	10	0 (0%)
Maladie de Hashimoto	10	0 (0%)
Ab positive Hsp-70	10	0 (0%)
Positive Facteur Rhumatoïde	10	1 (10%)
Total	50	1 (2%)

## Précision

La précision inter-tests a été déterminée avec 3 échantillons positifs sélectionnés parmi la gamme de test. Les tests multiples ont été réalisés à des moments différents. La précision intra-test a été calculée sur la base de 10 réplifications de 3 échantillons. Sur base de ces réplifications, le Coefficient de Variation (CV) a été calculé. Les CV inter-tests et intra-test allaient de 5 à 13%.

### Linéarité :

Pour déterminer l'acceptabilité de linéarité, des lamelles ont été testées avec des doubles dilutions d'un étalon de valeur connue. Les valeurs  $r^2$  de la courbe standard ont été déterminées pour les tests multiples. Une valeur  $r^2$  plus grande que 0.95 est considérée comme acceptable. La valeur moyenne  $r^2$  de ce test est 0.9977 avec aucune valeur inférieure à 0.9972.

### Récupération

Des échantillons avec des concentrations connues d'anticorps oxLDL ont été mélangés aux dilutions appropriées d'un autre échantillon positif avec des quantités connues d'anticorps oxLDL. Les niveaux d'anticorps des échantillons mélangés ont été déterminés et à partir de ces valeurs on a calculé le pourcentage de récupération. Les résultats sont les suivants :

Echantillons	S1 (EU/ml)	S2 (EU/ml)	EU/ml Attendu	EU/ml Obtenu	% Récupération (Obtenu/Attendu)
Mélange 1	43.6	42.2	42.9	49.4	115.2%
Mélange 2	37.1	60.2	48.6	50.4	103.6%
Mélange 3	20.1	52.9	36.5	38.0	104.0%
Mélange 4	78.9	65.3	72.1	84.3	116.9%
Mélange 5	178.5	152.8	165.7	171.3	103.4%

### Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant des sérums avec des niveaux connus d'anticorps oxLDL avec des échantillons de sérum potentiellement interférents et en étudiant la déviation par rapport aux résultats attendus. Les résultats se trouvent ci-dessous.

Mélange*	S1 (EU/ml)	S2 (EU/ml)	EU/ml Attendu	EU/ml Obtenu	%Interférence
H1	24.0	19.1	21.6	24.1	111.8%
L1	24.0	14.0	19.0	19.9	104.9%
H2	42.3	19.1	30.7	26.8	87.2%
L2	42.3	14.0	28.1	24.0	85.4%
H3	79.3	21.5	50.4	48.3	95.9%
L3	79.3	18.6	48.9	48.9	99.9%
H4	189.8	12.2	101.0	131.8	130.5%
L4	189.8	2.1	95.9	117.1	122.1%
H5	167.9	24.6	96.3	101.3	105.3%
L5	167.9	11.6	89.8	104.1	115.9%

\* H=Hémolytique, L=Lipémique, S = Echantillon.



# Anticorpi anti-LDL Ossidate (oxLDL) ELISA

IVD

## INSERTO DEL PRODOTTO

REF 38085 Anticorpi anti-LDL Ossidate (oxLDL) ELISA 96 Determinazioni

### USO PREVISTO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione qualitativa e semi-quantitativa di anticorpi anti-lipoproteine ossidate a bassa densità (oxLDL) nel siero umano.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Gli anticorpi anti-oxLDL sono associati con alcune condizioni cliniche quali l'aterosclerosi, la stenosi carotidea ed altre malattie coronariche. Gli anticorpi anti-oxLDL possono essere presenti anche in altre patologie quali l'ipertensione diabetica e l'endometriosi.<sup>1-5</sup>

L'ipercolesterolemia è strettamente associata ad un maggior rischio di sviluppare aterosclerosi.<sup>4,6</sup> Il colesterolo che si accumula nella placca aterosclerotica deriva principalmente da lipoproteine a bassa densità (LDL). L'ossidazione della LDL è ampiamente accettata come un evento critico nel processo aterogenico.<sup>7</sup> I radicali liberi come il superossido e l'ossido nitrico (-O<sub>2</sub>, NO) generati nelle reazioni biologiche che avvengono nell'organismo, contribuiscono all'ossidazione delle LDL.<sup>8,9</sup> È stato dimostrato che il radicale NO è responsabile per l'ossidazione dell'apolipoproteina B, un costituente delle LDL. Similmente, le lipossigenasi e ossidanti come il perossinitrito possono ossidare le frazioni lipidiche delle LDL. È stato dimostrato che le LDL ossidate e le LDL non native vengono captate dai recettori scavenger presenti sui monociti, sulle cellule del muscolo liscio e sui macrofagi nei vasi sanguigni. L'ossidazione delle LDL accresce l'affinità delle LDL ossidate per i recettori acetici dei macrofagi.<sup>10</sup> Dato che questo percorso della captazione delle LDL ossidate non è regolato, da luogo alla formazione di macrofagi "carichi" di lipidi (cellule schiumose). La presenza di cellule schiumose costituisce il primo passo nella formazione della placca aterosclerotica nei vasi sanguigni. Successivamente, altre molecole infiammatorie rilasciate dai leucociti promuovono la progressione della placca aterosclerotica.<sup>11,12</sup> Gli anticorpi contro le oxLDL ed i loro complessi sono stati dimostrati essere presenti nelle condizioni di lupus eritematoso sistemico, diabete, trombosi arteriosa, ipertensione, ecc.

### PRINCIPI DELLA METODICA

Il test viene eseguito come test immunoenzimatico in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con l'antigene oxLDL segue poi una fase di bloccaggio per ridurre il legame non specifico delle proteine durante il ciclo dell'analisi. Controlli, calibratori e sieri dei pazienti vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene per consentire il legame degli anticorpi specifici presenti nel campione all'antigene. Gli anticorpi non legati ed altre proteine sieriche vengono rimossi mediante lavaggio dei pozzetti. Gli anticorpi legati vengono rilevati per l'aggiunta nei pozzetti di un coniugato anti-IgG umane marcato con enzima. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Viene poi aggiunto nei pozzetti un substrato enzimatico specifico (TMB) e la presenza degli anticorpi viene rilevata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato TMB in un derivato colorato della reazione. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento della colorazione, che è proporzionale alla concentrazione dell'anticorpo, viene letta avvalendosi di uno spettrofotometro a 450 nm. I risultati sono espressi in unità ELISA per millimetro (EU/ml) e registrati come positivi o negativi.

### REAGENTI

#### Conservazione e Preparazione

Conservare tutti i reagenti da 2 a 8°C. **Non congelare.**

Non usare il reagente se non è limpido o se è presente del precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso.

Ricostituire il tampone di lavaggio ad 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Se conservato ad una temperatura tra 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza indicata per il kit. Le strisce dei pozzetti rivestiti sono monouso.

### Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana inclusi nel kit sono stati testati per la presenza di HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi ai test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni dei pazienti devono essere considerati come potenzialmente infetti. Attenersi alle buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali.<sup>13</sup>

**Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo.** Non sostituire i componenti del kit con materiali di altri produttori. Attenersi alle buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica ed incrociata dei reagenti durante il maneggiamento. Non usare componenti del kit che abbiano superato la data di scadenza riportata sull'etichetta.









### Materiali Forniti

Zenit oxLDL ELISA [REF] 38085

Il kit contiene una quantità di reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni.

12 x 8	MICROPLATE oxLDL	Micropiastre con micropozzetti individuali separabili. Rivestiti con antigene LDL ossidate. Pronte all'uso.
1 x 1,75 ml	CONTROL+ oxLDL	<b>Controllo Positivo</b> ( <i>tappo rosso</i> ). Pronto all'uso. Contiene siero umano positivo agli anticorpi anti-oxLDL. L'intervallo di concentrazione atteso in EU/ml è stampato sull'etichetta.
1 x 1,75 ml	CONTROL-	<b>Controllo Negativo</b> ( <i>tappo bianco</i> ). Pronto all'uso. Contiene siero umano.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A oxLDL CALIBRATOR B oxLDL CALIBRATOR C oxLDL CALIBRATOR D oxLDL CALIBRATOR E oxLDL	<b>Set di 5 Calibratori</b> pronti all'uso. Derivati da siero umano contenente anticorpi anti-oxLDL. Le concentrazioni in EU/ml sono stampate sulle etichette. Calibratore A ( <i>tappo verde</i> ) 320 EU/ml; Calibratore B ( <i>tappo viola</i> ) 80 EU/ml; Calibratore C ( <i>tappo blu</i> ) 40 EU/ml; Calibratore D ( <i>tappo giallo</i> ) 20 EU/ml, e Calibratore E ( <i>tappo arancione</i> ) 1 EU/ml.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP (capra) anti-IgG umane. Pronto all'uso. Codificato colore rosa.
1 x 60 ml	DIL	Diluente del siero. Pronto all'uso. Codificato colore verde.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrato enzimatico TMB. Pronto all'uso. <b>Proteggere dalla luce.</b>
1 x 15 ml	STOP	Soluzione di stop. Pronta all'uso.
2 x	BUF WASH	Tampone di lavaggio in polvere. <b>Ricostituire ciascuno ad un litro.</b>

### Simboli usati sulle etichette

-  Numero di lotto
-  Numero di articolo
-  Per uso diagnostico *in vitro*
-  Utilizzare entro il
-  Temperatura di conservazione
-  Leggere le istruzioni prima dell'uso
-  Numero di test
-  Produttore

### Materiali necessari non forniti

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone di dispensazione per contenere il tampone di lavaggio diluito
- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso per le pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Salviette di carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 450 nm. Se si dispone di un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm
- Dispositivo automatico di lavaggio per micropiastre in grado di dispensare 200 µl

### RACCOLTA E MANEGGIAMENTO DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati unicamente campioni di siero. I campioni di siero fortemente emolizzati, lipemici o contaminati da agenti microbici possono interferire con le prestazioni del test e pertanto non devono essere usati. Conservare i campioni da 2° a 8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, congelare i campioni di siero. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni.

### PROCEDURA

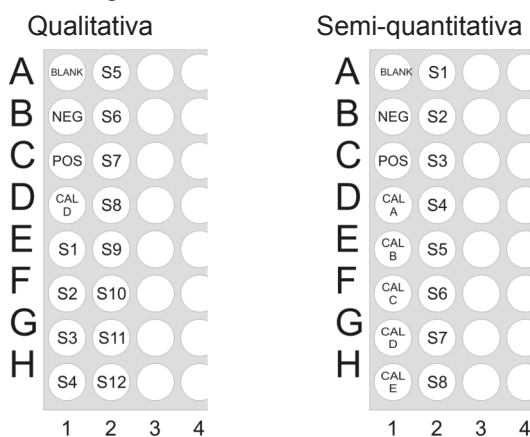
#### Note sul test

- Leggere attentamente l'insero del prodotto prima di avviare la procedura di analisi.
- Preparare tutte le diluizioni dei campioni dei pazienti prima di procedere con le analisi.
- Portare i campioni dei pazienti ed i reagenti del test a temperatura ambiente prima dell'uso. Si consiglia di lasciar riposare i reagenti sul banco di lavoro fuori dalla loro scatola per 30 minuti prima dell'uso. Riporre tutti i campioni ed i reagenti inutilizzati in frigo immediatamente dopo l'uso.
- Rimuovere i pozzetti necessari dall'involucro e sigillare nuovamente la confezione per prevenire la formazione di condensa nei pozzetti inutilizzati. Riporre immediatamente la confezione in frigo.
- **Una tecnica di lavaggio ottimale è particolarmente importante.** Se il lavaggio viene eseguito manualmente, un lavaggio adeguato si ottiene dirigendo un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga sull'intera micropiastra. **Si raccomanda l'uso di un dispositivo di lavaggio automatico per micropiastre.**

- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 o 12 pozzetti simultaneamente. La procedura risulta più rapida e garantisce tempi di incubazione più uniformi.
- Per tutte le fasi, è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione devono iniziare con il completamento dell'aggiunta del reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti deve essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
- **La micropiastra deve essere incubata al buio sia nella fase di incubazione dei campioni che del coniugato e del substrato. L'esposizione alla luce durante il periodo di incubazione può dar luogo a risultati errati.**

### Metodo del test

- Fase 1** Lasciar equilibrare a temperatura ambiente tutti i reagenti ed i campioni.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. È buona pratica di laboratorio analizzare i campioni in duplicato.
- Fase 3** Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Calibratore D (*tappo giallo*).  
oppure  
Per una **determinazione semi-quantitativa** usare i Calibratori da A ad E come illustrato nell'esempio di disposizione riportato di seguito.



- Fase 4** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di siero con **500µl** di Diluente del Siero.
- Fase 5** Prelevare il numero necessario di pozzetti dall'involucro e riporre le strisce inutilizzate in frigo nella loro confezione sigillata. Posizionare le micropiastre nel supporto in dotazione.
- Fase 6** Pipettare **100 µl** di Calibratori pronti all'uso, di controlli Positivi e Negativi e di campioni diluiti del paziente (**1:101**) nei relativi pozzetti come indicato sul foglio protocollo.  
**Nota:** Includere un pozzetto che contenga **100 µl** di Diluente del Siero che servirà da bianco reagente. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco reagente.
- Fase 7** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente e al buio.
- Fase 8** Lavare **4x** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Rimuovere il liquido da ciascun pozzetto invertendo e battendo la piastra o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare al termine dell'ultimo lavaggio, capovolgere la piastra e batterla energicamente su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatici, programmare lo strumento secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 9** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente e al buio.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 8.



- Fase 12** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente e al buio.
- Fase 14** Pipettare **100 µl** di Soluzione di Stop in ciascun pozzetto con nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del Substrato Enzimatico. Leggere i valori dell'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di Stop.
- Fase 15** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto, a **450 nm** se si usa un lettore a singola lunghezza d'onda o a 450/630nm con un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, contro il bianco reagente impostato ad assorbanza 0.

### Controllo di Qualità

Devono essere testati Calibratori, Controlli Positivi e Negativi ed un bianco per ciascuna analisi per verificare l'integrità e l'accuratezza dell'analisi. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere  $<0,3$ . Il Calibratore A deve avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1,0, altrimenti è necessario ripetere il test. Il Controllo Negativo deve essere  $<20$  EU/ml. Se l'analisi viene eseguita in duplicato, è necessario prendere la media delle due letture per determinare le EU/ml.

Per l'esecuzione delle determinazioni qualitative, la densità ottica del Calibratore D deve essere superiore a quella del Controllo Negativo e inferiore all'assorbanza del Controllo Positivo. Per le determinazioni semi-quantitative il Controllo Positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo dichiarato sulla fiala.

### RISULTATI

#### Calcoli

Le concentrazioni dei campioni devono essere determinate con uno dei seguenti due metodi:

#### 1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

Ass. Campione Test

----- x EU/ml di Calibratore D = EU/ml del Campione

Ass. Calibratore D

#### 2. DETERMINAZIONE SEMI-QUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza del Calibratore da A ad E contro le loro rispettive concentrazioni su carta millimetrata in scala lineare logaritmica. Tracciare le concentrazioni in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare una curva attraverso i punti. Determinare dalla curva le concentrazioni dei campioni dei pazienti contro i corrispondenti valori di assorbanza. In alternativa, può essere usata una curva a quattro parametri per tracciare la curva standard.

#### Calibratori

Nel kit sono inclusi dei Calibratori pronto all'uso utili alla semi-quantificazione e devono essere utilizzati in ciascuna serie di analisi. I campioni dei pazienti contenenti livelli di anticorpi più alti, possono dare valori di assorbanza maggiori rispetto a quelli del Calibratore A. Per determinare valori semi-quantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere diluiti ulteriormente affinché rientrino nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

#### Interpretazione

I valori dell'interpretazione sono stati determinati analizzando campioni provenienti da 64 donatori di sangue adulti normali. La media dei soggetti normali più 2 DS è stabilita essere la soglia dell'analisi alla quale è stato assegnato un valore arbitrario di 20 EU/ml. A. Menarini Diagnostics suggerisce di usare l'intervallo di riferimento riportato di seguito. Ciascun laboratorio dovrebbe convalidare i valori delle analisi in base alle proprie condizioni.

Valore As oxLDL	Interpretazione
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminato (Borderline)
>25 EU/ml	Positivo

#### LIMITAZIONI DEL TEST

In questa procedura devono essere usati unicamente campioni di siero. I campioni di siero fortemente emolizzati, lipemici o contaminati da agenti microbici possono interferire con le prestazioni del test e pertanto non devono essere usati. Conservare i campioni da 2° a 8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, congelare i campioni di siero. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni. I risultati ottenuti con quest'analisi non sono da ritenere di per sé diagnostici e dovrebbero essere valutati in congiunzione ad altre valutazioni cliniche eseguite per il paziente. Per qualsiasi risultato borderline ottenuto per un paziente dovrebbero essere ripetuti i test per confermare il risultato. Si raccomanda inoltre di testare i campioni dei pazienti che hanno prodotto risultati borderline ad intervalli di tempo appropriati.

#### VALORI ATTESI

I risultati ottenuti con questo test sono previsti essere negativi in una popolazione normale di pazienti. Gli anticorpi anti-LDL ossidate si riscontrano in pazienti affetti da aterosclerosi, diabete, LES e disturbi indotti da stress.

#### Caratteristiche della performance

A. Associazione malattia: Il test Zenit oxLDL Antibody ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-LDL ossidate è stato valutato analizzando sieri di pazienti affetti dalle condizioni associate riportate nella letteratura, sieri di controllo della malattia ottenuti da pazienti con malattie autoimmuni non associate e sieri di controllo ottenuti da soggetti normali. I risultati di questi test ed il numero dei campioni di siero raccolti per ciascuna popolazione sono riassunti di seguito.

Popolazione	n	oxLDL As Pos n (%)
Coronaropatia	9	7 (78%)
Positivo anticorpi fosfolipidi	57	33 (58%)
Controlli malattia	50	1 (2%)
Normali	100	4 (4%)

B. Reattività incrociata: Sono stati testati per gli anticorpi anti-oxLDL complessivamente 50 campioni con potenziale reattività-incrociata raccolti da individui affetti da altri disturbi autoimmuni o risultati positivi ad altri anticorpi utilizzando il sistema Zenit oxLDL.

Condizione	n	oxLDL As Pos n (%)
Antinucleari As positiva	10	0 (0%)
Peptide ciclico citrullinato As positiva	10	0 (0%)
Tiroidite di Hashimoto	10	0 (0%)
Hsp-70 As positiva	10	0 (0%)
Fattore reumatoide positivo	10	1 (10%)
Totale	50	1 (2%)

#### Precisione

La precisione nella serie è stata testata utilizzando 3 campioni positivi selezionati nell'intervallo complessivo dell'analisi. I cicli multipli dell'analisi sono stati eseguiti in tempi distinti. La precisione tra le serie è stata calcolata

sulla base di 10 replicati eseguiti su 3 campioni. Sulla base di questi replicati è stato calcolato il Coefficiente di Variazione (CV). Il CV nell'analisi e tra le analisi è risultato essere tra il 5 ed il 13%.

### Linearità

Per determinare una linearità accettabile, le micropiastre sono state analizzate con calibratori con valori noti. Sono stati determinati i valori r-quadrato delle risultanti curve standard per le analisi multiple. Un valore r-quadrato superiore a 0,95 è ritenuto essere accettabile. Il valore r-quadrato medio per queste analisi nel test di precisione era di 0,9977 con nessun valore ottenuto al di sotto di 0,9972.

### Recupero

I campioni con livelli noti di anticorpi anti-oxLDL sono stati mescolati con diluizioni appropriate di altri campioni positivi con quantitativi noti di anticorpi anti-oxLDL. Sono stati determinati i livelli degli anticorpi dei campioni miscelati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campioni	C1 (EU/ml)	C2 (EU/ml)	EU/ml Attesi	EU/ml Ottenuti	% Recupero (Ottenuti/Attesi)
Miscela 1	43,6	42,2	42,9	49,4	115,2%
Miscela 2	37,1	60,2	48,6	50,4	103,6%
Miscela 3	20,1	52,9	36,5	38,0	104,0%
Miscela 4	78,9	65,3	72,1	84,3	116,9%
Miscela 5	178,5	152,8	165,7	171,3	103,4%

### Interferenza

Sono stati eseguiti studi di interferenza usando sieri mescolati con livelli noti di anticorpi anti-oxLDL a campioni di siero potenzialmente interferenti ed è stata studiata la deviazione dai risultati attesi. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Miscela*	C1 (EU/ml)	C2 (EU/ml)	EU/ml Attesi	EU/ml Ottenuti	% Interferenza
H1	24,0	19,1	21,6	24,1	111,8%
L1	24,0	14,0	19,0	19,9	104,9%
H2	42,3	19,1	30,7	26,8	87,2%
L2	42,3	14,0	28,1	24,0	85,4%
H3	79,3	21,5	50,4	48,3	95,9%
L3	79,3	18,6	48,9	48,9	99,9%
H4	189,8	12,2	101,0	131,8	130,5%
L4	189,8	2,1	95,9	117,1	122,1%
H5	167,9	24,6	96,3	101,3	105,3%
L5	167,9	11,6	89,8	104,1	115,9%

\* H=Emolitici, L=Lipemici.



# ELISA para Anticorpos anti-LDL oxidada (oxLDL)

IVD

## FOLHETO DO PRODUTO

REF 38085 ELISA anticorpos anti-LDL oxidada (oxLDL) 96 Determinações

### APLICAÇÃO

É um exame de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti- lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL) em soro humano.

### RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos anti-LDL oxidada estão associados a patologias clínicas tais como a aterosclerose, a estenose das carótidas e outras disfunções das artérias coronárias. Os anticorpos anti-LDL oxidada também podem ser significativos em doenças tais como a diabetes, a hipertensão e a endometriose.<sup>1-5</sup>

A hipercolesterolemia está directamente associada a um aumento do risco de aterosclerose.<sup>4,6</sup> O colesterol acumulado na placa aterosclerótica provém principalmente da lipoproteína de baixa densidade (LDL). A oxidação da LDL é hoje em dia aceite como um acontecimento crucial no processo aterogénico.<sup>7</sup> Os radicais livres, como os superóxidos e os óxidos nítricos ( $-O_2$ , NO) produzidos nas reacções biológicas que ocorrem no corpo podem contribuir para a oxidação da LDL.<sup>8,9</sup> Foi demonstrado que o radical NO oxida a apolipoproteína B, um constituinte da LDL. Da mesma forma, as lipoxigenases e os oxidantes como o peroxinitrito podem oxidar as metades lipídicas da LDL. Foi demonstrado que a oxLDL, e não a LDL nativa, é removida por receptores de de depuração presentes em monócitos, em células do músculo liso e em macrófagos nos vasos sanguíneos. A oxidação da LDL aumenta a afinidade da oxLDL para os receptores acetilo dos macrófagos.<sup>10</sup> Como esta via de captação de oxLDL não é regulada, tem como resultado a formação de macrófagos carregados de lípidos (células esponjosas). A presença de células esponjosas é o passo mais precoce na formação da placa aterosclerótica nos vasos sanguíneos. Posteriormente, outras moléculas inflamatórias libertadas pelos leucócitos promovem a progressão da placa aterosclerótica.<sup>11,12</sup>

Foram registados anticorpos anti-oxLDL e seus complexos em lupus eritematoso sistémico, nas diabetes, na trombose arterial, na hipertensão, etc.

### PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O teste é executado como um imunoensaio em fase sólida. Os micropoços são revestidos com antigénio oxLDL, seguindo-se uma fase de bloqueio para reduzir a ligação não específica das proteínas durante a execução do teste. Os controlos, os calibradores e as amostras de soros de doentes são incubados nos poços revestidos com antigénio, o que permite a ligação dos anticorpos específicos ao antigénio. Os anticorpos não ligados e outras proteínas do soro são removidos por lavagem dos micropoços. Os anticorpos ligados são detectados adicionando aos micropoços um conjugado de IgG anti-humano marcado com enzima. O conjugado não ligado é removido por lavagem. Em seguida é adicionado aos micropoços um substrato enzimático específico (TMB) sendo a presença de anticorpos detectada por uma mudança de cor produzida pela conversão do substrato TMB num produto de reacção colorido. A reacção é interrompida e altera-se a intensidade da cor, a qual será proporcional à concentração de anticorpos, e é lida por um espectrofotómetro a 450 nm. Os resultados são expressos em unidades ELISA por mililitro (EU/ml) e registados como positivos ou negativos.

### REAGENTES

#### Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes a uma temperatura entre 2 e 8°C. **Não congele.**

Não utilize se o reagente não estiver límpido ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20-25°C) no momento da utilização.

Reconstitua o tampão de lavagem em 1 litro de água destilada ou desionizada. Se conservado entre 2 e 8°C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até ao prazo de validade indicado no kit. As tiras de micropoços revestidas só devem ser utilizadas uma vez.

### Precauções

Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2, e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Respeite as normas laboratoriais em matéria de conservação, distribuição e eliminação desses materiais.<sup>13</sup>

**Para assegurar a obtenção de resultados válidos devem ser rigorosamente respeitadas as instruções que acompanham este kit.** Não troque os componentes do kit por componentes de origens diferentes. Respeite as normas em vigor em matéria de processos laboratoriais para minimizar as possibilidades de contaminação microbiana ou química dos reagentes durante o seu manuseamento. Não utilize os componentes do kit após o prazo de validade indicado nos rótulos.

### Materiais fornecidos

Zenit oxLDL ELISA REF 38085

Os kits contêm reagentes suficientes para efectuar 96 determinações.

12 x 8	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">MICROPLATE</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">oxLDL</span>	Microplaca com micropoços individuais destacáveis. Revestidos com antígenos de LDL oxidada. Pronto a usar.
1 x 1,75 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL+</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">oxLDL</span>	<b>Controlo Positivo</b> pronto a usar (tampa vermelha). Contém soro humano positivo a anticorpos oxLDL. O intervalo de concentração previsto em EU/ml está indicado no rótulo.
1 x 1,75 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL-</span>	<b>Controlo Negativo</b> pronto a usar ( <i>tampa branca</i> ). Contém soro humano.
5 x 1,75 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">A</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">oxLDL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">B</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">oxLDL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">oxLDL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">D</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">oxLDL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">E</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">oxLDL</span>	<b>Conjunto de 5 Calibradores</b> prontos a usar. Derivados de soro humano contendo anticorpos oxLDL. As concentrações em EU/ml estão indicadas nos rótulos. Calibrador A ( <i>tampa verde</i> ) 320 EU/ml; Calibrador B ( <i>tampa violeta</i> ) 80 EU/ml; Calibrador C ( <i>tampa azul</i> ) 40 EU/ml; Calibrador D ( <i>tampa amarela</i> ) 20 EU/ml, e Calibrador E ( <i>tampa laranja</i> ) 1 EU/ml.
1 x 15 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">IgG-CONJ</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">HRP</span>	IgG anti-humano na cabra HRP. Pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">DIL</span>	Diluyente de soro. Pronto a usar. Verde.
1 x 15 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">SUBSTRATE</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">TMB</span>	Substrato enzimático TMB. Pronto a usar. <b>Proteger da luz.</b>
1 x 15 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STOP</span>	Solução de paragem. Pronto a usar.
2 x	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">BUFWASH</span>	Tampão de lavagem em pó. <b>Reconstitua cada unidade em um litro.</b>



### Símbolos utilizados nos rótulos

	Número do lote
	Número do catálogo
	Uso em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Prazo de validade
	Temperatura de conservação
	Ler as instruções antes do uso
	Número de testes
	Fabricante

### Materiais necessários mas não fornecidos

- Água desionizada ou destilada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Pipetas para 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Temporizador
- Papel absorvente
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 450 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm
- Lavador automático de microplacas com capacidade de distribuição de 200 µl

### COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o desempenho do teste e, portanto, não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras entre 2 e 8°C por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos das amostras.

### PROCEDIMENTO

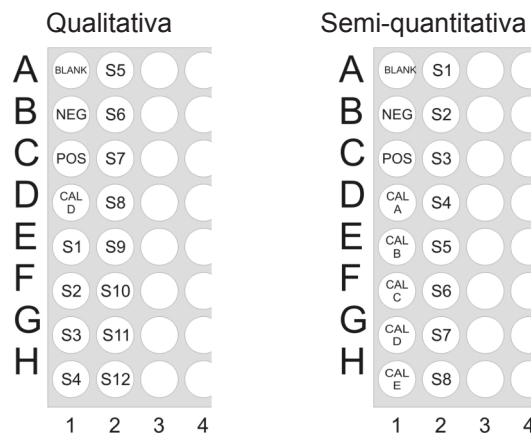
#### Notas sobre o procedimento

- Leia atentamente estas instruções antes de iniciar o teste.
- Prepare todas as diluições das amostras do doente antes de iniciar o teste.
- Deixe que todas as amostras do doente e os reagentes de teste estabilizem à temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento de teste. Aconselha-se que os reagentes sejam deixados fora da embalagem durante 30 minutos antes da sua utilização. Guarde as amostras e os reagentes não utilizados no frigorífico imediatamente depois do uso.
- Retire as tiras de micropoços necessárias da embalagem e feche-a bem para evitar a condensação nos poços não usados. Coloque imediatamente a embalagem no frigorífico.
- **É imprescindível uma boa técnica de lavagem.** Se a lavagem for efectuada manualmente, essa deve ser executada dirigindo um jacto forte de tampão de lavagem com um frasco de borrifo com um bico largo ao longo de toda a microplaca. **Aconselha-se a utilização de um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 ou 12 poços simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura tempos de incubação mais uniformes.

- São muito importantes os tempos de cada passo. Os períodos de incubação iniciam após a distribuição dos reagentes.
- A distribuição de todas as amostras e reagentes deve ser efectuada com os mesmos intervalos e na mesma ordem.
- **Assegure-se que as incubações na microplaca se dêem no escuro. Inclui os passos de incubação da amostra, conjugado e substrato. A exposição à luz durante a incubação pode afectar os resultados.**

### Método de teste

- Passo 1** Deixe estabilizar todos os reagentes e as amostras à temperatura ambiente.
- Passo 2** Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nos poços. É uma boa prática de laboratório testar as amostras em duplicado.
- Passo 3** Para uma **determinação qualitativa** use somente o Calibrador D (*tampa amarela*).  
 ou  
 Para uma **determinação semi-quantitativa** use os Calibradores A a E como ilustrado no exemplo abaixo.



- Passo 4** Prepare uma diluição **1:101** das amostras do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **500µl** de Diluente do Soro.
- Passo 5** Retire os micropoços necessários da embalagem e coloque as tiras que não precisa dentro da embalagem bem fechada e depois no frigorífico. Coloque bem os micropoços no suporte acessório fornecido.
- Passo 6** Junte **100 µl** de Calibradores prontos a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente diluídas (**1:101**) nos respectivos micropoços indicados na folha de protocolo.  
**Nota:** Inclua um poço com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente.
- Passo 7** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente no escuro.
- Passo 8** Lave **4 vezes** com o tampão de lavagem. Em caso de lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido virando os poços e batendo para que saia o conteúdo de cada um ou aspirando o líquido de cada poço. Para enxugar no final da última lavagem, vire as tiras e bata os poços com força em papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.
- Passo 9** Junte **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- Passo 10** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente no escuro.
- Passo 11** Lave todos os micropoços como ilustrado no Passo 8.
- Passo 12** Junte **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma sequência e tempos do Conjugado.



- Passo 13** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente no escuro.
- Passo 14** Junte **100  $\mu$ l** de Solução de Paragem em cada micropoço procedendo com a mesma sequência e tempos do Substrato Enzimático. Leia os valores de absorvância no prazo de 1 hora depois de juntar a Solução de Paragem.
- Passo 15** Leia a absorvância de cada micropoço a **450 nm** usando um leitor de microplacas de comprimento de onda simples ou duplo a 450/630nm em relação ao branco de reagente em absorvância zero.

### Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivos e Negativos e o branco de reagente devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do branco do reagente deverá ser  $<0,3$ . O Calibrador A deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário o teste deverá ser repetido. O controlo negativo deverá ser  $<20$  EU/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, calcule a média das duas leituras para determinar as EU/ml. Durante a execução das determinações qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deverá superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Para determinações semi-quantitativas, o controlo positivo deverá dar valores dentro do intervalo indicado no frasco.

## RESULTADOS

### Cálculos

As concentrações das amostras podem ser determinadas por dois métodos:

#### 1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

##### Abs. da Amostra de Teste

$$\frac{\text{Abs. da Amostra de Teste}}{\text{Abs. do Calibrador D}} \times \text{EU/ml de Calibrador D} = \text{EU/ml Amostra de Teste}$$

#### 2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

Registe a absorvância dos Calibradores A a E em relação às respectivas concentrações num papel milimétrico. Registe as concentrações em EU/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e trace a curva melhor de ponto a ponto. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva de acordo com os respectivos valores de absorvância. Em alternativa pode-se usar uma curva de quatro parâmetros para traçar a curva padrão.

### Calibrador

Os calibradores prontos a usar são incluídos para assegurar a semi-quantificação e devem ser usados em todos os testes. As amostras de doente que contêm níveis altos de anticorpos podem dar valores superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semi-quantitativos com precisão, essas amostras devem ser mais diluídas de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando são novamente testadas. Para a determinação dos valores de EU/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

### Interpretação

Os valores de interpretação são determinados testando 64 dadores de sangue adultos normais. Foi estabelecida como cutoff do ensaio a média dos indivíduos normais mais 2 SD e atribuído um valor arbitrário de 20 EU/ml. A A. Menarini Diagnostics sugere o uso do intervalo de referência abaixo ilustrado. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais.

#### Valor de abs. oxLDL Interpretação

$<20$ EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminado (limiar)
$>25$ EU/ml	Positivo



## LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o desempenho do teste e, portanto, não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras a uma temperatura entre 2 e 8°C por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos das amostras.

Os resultados obtidos somente com este ensaio não constituem um diagnóstico e devem ser considerados em conjunto com o quadro clínico do doente. Qualquer resultado com reactividade limiar deve ser repetido para confirmação do resultado. Recomenda-se igualmente que os doentes com resultados limiares sejam novamente testados em intervalos adequados.

## VALORES PREVISTOS

Normalmente, os valores previstos numa população normal são negativos. Os anticorpos anti-oxLDL estão presentes em doentes com aterosclerose, diabetes, LES e perturbações indutíveis por stress.

### Características de desempenho

A. Associação de doenças: O ELISA para anticorpos anti oxLDL Zenit para a detecção de anticorpos anti-oxLDL foi avaliado testando os soros de doentes com condições associadas, como indicado na literatura, soros de controlo da doença de doentes com doenças auto-imunes desassociadas e soros de controlo de indivíduos normais saudáveis. Os resultados desses testes e o número de soros recolhidos de cada população estão abaixo resumidos.

População	n	Ab Pos oxLDL n (%)
Doença artéria coronária	9	7 (78%)
Positivo anticorpos fosfolipídicos	57	33 (58%)
Controlos doença	50	1 (2%)
Normais	100	4 (4%)

B. Reacção cruzada: Foi testado um total de 50 amostras com potencial reacção cruzada de indivíduos com outras patologias auto-imunes ou positivos a outros auto-anticorpos, para a determinação de anticorpos anti-oxLDL usando o sistema Zenit oxLDL.

Condição	n	Abs pos oxLDL n (%)
Ab anti-nuclear positiva	10	0 (0%)
Ab Péptido citrulinado cíclico positiva	10	0 (0%)
Doença de Hashimoto	10	0 (0%)
Ab Hsp-70 positiva	10	0 (0%)
Factor Reumatóide positivo	10	1 (10%)
Total	50	1 (2%)

### Precisão

A precisão inter-ensaio foi testada com 3 amostras positivas seleccionadas no intervalo do ensaio. Foram efectuados testes múltiplos em tempos separados. A precisão intra-ensaios foi calculada baseando-se em 10 repetições de 3 amostras. O Coeficiente de Variação (CV) foi calculado baseando-se nessas repetições. Intervalo de CV inter-ensaio e de intra-ensaio de 5 a 13%.

### Linearidade

Para determinar uma linearidade aceitável, as placas foram testadas com calibradores de valor conhecido. Os valores do coeficiente de determinação das curvas padrão obtidas foram calculados para testes múltiplos. Um coeficiente de determinação superior a 0,95 é considerado aceitável. O coeficiente de determinação médio para estes testes em ensaios de precisão foi de 0,9977 não se tendo verificado nenhum valor inferior a 0,9972.

### Recuperação

Amostras com níveis de anticorpos anti-oxLDL foram misturadas com diluições apropriadas de outras amostras positivas com quantidades conhecidas de anticorpos anti-oxLDL. Foram determinados os níveis de anticorpos das amostras misturadas e utilizados para calcular a percentagem de recuperação. Os resultados foram os seguintes:

Amostras	S1 (EU/ml)	S2 (EU/ml)	EU/ml Previstos	EU/ml Obtidos	% Recuperação (Obtidos/Previstos)
Mistura 1	43,6	42,2	42,9	49,4	115,2%
Mistura 2	37,1	60,2	48,6	50,4	103,6%
Mistura 3	20,1	52,9	36,5	38,0	104,0%
Mistura 4	78,9	65,3	72,1	84,3	116,9%
Mistura 5	178,5	152,8	165,7	171,3	103,4%

### Interferências

Foram estudadas as interferências misturando soro com níveis conhecidos de anticorpos anti-oxLDL com amostras de soro potencialmente interferentes e analisando o desvio dos resultados previstos. Os resultados foram os seguintes.

Mistura*	S1 (EU/ml)	S2 (EU/ml)	EU/ml Prevista	EU/ml Obtida	%Interferência
H1	24,0	19,1	21,6	24,1	111,8%
L1	24,0	14,0	19,0	19,9	104,9%
H2	42,3	19,1	30,7	26,8	87,2%
L2	42,3	14,0	28,1	24,0	85,4%
H3	79,3	21,5	50,4	48,3	95,9%
L3	79,3	18,6	48,9	48,9	99,9%
H4	189,8	12,2	101,0	131,8	130,5%
L4	189,8	2,1	95,9	117,1	122,1%
H5	167,9	24,6	96,3	101,3	105,3%
L5	167,9	11,6	89,8	104,1	115,9%

\* H=Hemolíticas, L=Lipêmicas, S = Amostra.

## REFERENCES

1. Pengo V et al. *Thromb Res.* 2008;122:556-9.
2. Shoji T et al. *Kidney Int.* 2002;62:2230-7.
3. Wu R et al. *J Autoimmun.* 2005;24:353-60.
4. Piarulli F et al. *Diabetes Care.* 2005 Mar;28:653-7.
5. Craig WY et al. *Clin Chem.* 1994; 40:882-888.
6. Steinberg D. *Arteriosclerosis.* 1983; 3:283-301.
7. Witztum JL, Steinberg D. *J Clin Invest.* 1991; 88:1785-1792.
8. Frei B. *Am J Med.* 1994; 97:5S-13S.
9. Chang GJ et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994; 14:1808-14.
10. Steinberg D, Witztum JL. *JAMA.* 1990; 264:3047-3052.
11. Diaz MN et al. *New Eng J Med.* 1997; 337:408-416.
12. Hamilton CA. *Pharmacol Ther.* 1997; 74:55-72.
13. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.* Centers for Disease Control National Institutes of Health. 1993; (HHS Pub No [CDC] 93-8395).



**A. Menarini Diagnostics S.r.l.**  
via Sette Santi 3  
50131 Firenze  
Italia

---

**UK**

**UNITED KINGDOM**

Distributed by

A. Menarini Diagnostics Ltd  
405 Wharfedale Road  
Winnersh - Wokingham  
Berkshire RG41 5RA

**EL**

Διανέμεται στην  
**ΕΛΛΑΔΑ** από την

A. Menarini Diagnostics S.A.  
575, Vouliagmenis Ave.  
16451 Argyroupolis  
Attiki

**ES**

**ESPAÑA**

Distribuido por

A. Menarini Diagnosticos  
S.A.  
Avenida del Maresme, 120  
08918 Badalona  
Barcelona

**DE**

**DEUTSCHLAND**

Vertrieb durch

A. Menarini Diagnostics  
Eine Division der Berlin-  
Chemie AG  
Glienicke Weg 125  
12489 Berlin

**AT**

**ÖSTERREICH**

Vertrieb durch

A. Menarini Ges.m.b.H  
Pottendorfer Straße, 25/27  
A - 1120 Wien

**FR**

**FRANCE**

Distribué par

A. Menarini Diagnostics  
France S.A.R.L.  
3-5, Rue du Jura  
BP 70511  
94633 Rungis Cedex

**BE**

**BELGIQUE**

Distribué par

A. Menarini Diagnostics  
Benelux S.A./N.V.  
Belgicastraat, 4  
1930 Zaventem

**IT**

**ITALIA**

Distribuito da

A. Menarini Diagnostics  
Via lungo l'Ema, 7  
50012 Bagno a Ripoli  
Firenze

**PT**

**PORTUGAL**

Distribuido por

A. Menarini Diagnósticos, Lda  
Quinta da Fonte  
Edifício D.Manuel I, 2ºB  
2770-203 Paço de Arcos

**NL**

**NEDERLAND**

Distributed by

A. Menarini Diagnostics  
Benelux N.V.  
De Haak, 8  
5555 XK Valkenswaard

---

EN > Revision date: May 2010  
EL > Ημερομηνία αναθεώρησης: Μάιος 2010  
ES > Fecha de revisión: Mayo de 2010  
DE > Datum der Überarbeitung: Mai 2010  
FR > Date de révision: Mai 2010  
IT > Data di revisione: Maggio 2010  
PT > Data de revisão: Maio de 2010

Document No. PI5158 M

