

Lp(a) ELISA

Enzyme immunoassay (microtiter strips) for the quantitative determination of Lipoprotein a [Lp(a)] in Human Serum, Citrate and EDTA Plasma.

REF **RE59011**

 **12x8**

   **2-8 °C**

EU: **IVD**  U.S.: *For in-vitro diagnostic use only. 510(k) exempt.*



I B L I N T E R N A T I O N A L G M B H

Flughafenstrasse 52a
D-22335 Hamburg, Germany

Phone: +49 (0)40-53 28 91-0
Fax: +49 (0)40-53 28 91-11

IBL@IBL-International.com
www.IBL-International.com

Lp(a)

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Lipoprotein (a) [Lp(a)] in Humanserum, Citrat- und EDTA-Plasma

Art. Nr.: RE59011 96 Tests
Lagerung: 2–8 °C



Instruction sheet / Gebrauchsanweisung / Carnet d'instruction / instrucciones de uso / gebruiksaanwijzing / istruzioni per l'uso / σελιδα οδηγιων / bruksanvisning / modo de emprego: www.ibl-International.com

1. Einleitung

Lipoprotein(a) [Lp(a)] ist ein genetisch determinierter, unabhängiger Risikofaktor für Arteriosklerose. Über die physiologische Funktion und den Metabolismus von Lp(a) ist wenig bekannt. Die Serumkonzentration dieses Lipoproteins liegt zwischen 0 und 200 mg/dl. Konzentrationen von über 30 mg/dl erhöhen das Risiko der Arterioskleroseentstehung deutlich, insbesondere bei gleichzeitiger Erhöhung des LDL-Cholesterins.

Die Struktur des Lp(a) läßt sich vom Aufbau des LDL-Partikels ableiten. Lp(a) ist ein LDL-Partikel, das über Disulfidbrücken mit dem hochglykosilierten Apo-Lipoprotein(a) [Apo(a)] verbunden ist. Sequenzhomologien von Apo(a) mit Plasminogen deuten auf einen Zusammenhang von gerinnungsphysiologischen und arteriosklerotischen Prozessen hin.

Lp(a) weist sowohl eine inter- als auch eine intraindividuelle Heterogenität in seiner Protein- und Lipidzusammensetzung auf. Bisher konnten mehr als 30 Isoformen charakterisiert werden. Ob diese Heterogenität Einfluss auf das relative Risiko der Arterioskleroseentstehung hat, ist nicht bekannt.

Im Gegensatz zu anderen Lipoproteinen kann die Lp(a)-Konzentration nicht diätetisch beeinflusst werden. Lipid-senker, die die LDL-Konzentration senken, beeinflussen Lp(a) nicht.

2. Indikationen des Tests

Bestimmung eines Risikofaktors für Arteriosklerose besonders bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen oder Myocardinfarkt.

3. Testprinzip

Der Lp(a) ist ein Einschritt-Sandwich-ELISA. Vertiefungen der ELISA-Teststreifen sind mit spezifischen, polyklonalen Antikörpern gegen Apo(a) beschichtet. Im ersten Inkubationsschritt (**Proben- und Konjugatinkubation**) werden verdünnte Serum- bzw. Plasmaproben zusammen mit dem Konjugat inkubiert. Das Konjugat besteht aus einem spezifischen, monovalenten, gegen Apo(a) gerichteten Fab-Fragment, das mit Peroxidase gekoppelt ist (Anti-Apo(a)-Peroxidase-Konjugat). Während der Inkubationszeit werden die Apo(a)-haltigen Partikel an die Festphase gebunden und gleichzeitig durch das Konjugat markiert. Unspezifische Probenbestandteile und ungebundenes Konjugat werden in einem Waschschritt entfernt. Im zweiten Inkubationsschritt erfolgt die **Substratreaktion**, wobei die Peroxidase des Konjugats das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einer blau gefärbten Substanz oxidiert. Durch anschließende Zugabe von Schwefelsäure wird diese Reaktion gestoppt, und es erfolgt ein Farbumschlag nach gelb. Die Farbintensität ist der Lp(a)-Konzentration direkt proportional. Bei einer Wellenlänge von 450 nm wird die Extinktion in einem ELISA-Reader gemessen. Über eine Bezugskurve wird die Lp(a)-Konzentration in der Probe quantitativ bestimmt.

4. Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien und Geräte

Aqua dest.

Röhrchen zur Probenverdünnung

Messzylinder (1000 ml)

Präzisionspipetten (5 µl, 10 µl, 200 µl und 1000 µl)

Pipetten (5 µl und 10 ml)

Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten (50 und 200 µl)

Probenmischer

Stoppuhr

ELISA-Reader mit 450 nm Filter

5. Packungsinhalt

[MTP], 12 Streifen mit je 8 Mikrotitervertiefungen, beschichtet mit affinitätsgereinigtem, spezifischen, polyklonalem Anti-Apo(a)-Antikörper vom Schaf, mit Trockenmittel im Aluminiumbeutel verpackt. Gebrauchsfertig!

[DILBUF], Pufferkonzentrat (10x), 0,4 M Tris/HCl, pH 8,4, detergentshaltig mit Stabilisatorprotein, 0,01% Thimerosal, 2 Flaschen je 100 ml. Vor Gebrauch verdünnen!

[CAL], Kalibratoren 1-5, lyophilisierte Humanseren mit Konservierungsmittel, jeweils 1 Flasche. **Die chargenabhängigen Lp(a)-Konzentrationen bitte den Flaschenetiketten entnehmen!** Vor Gebrauch verdünnen!

[Control LL], **[Control HL]**, Positive Kontrollseren, LL, "Low Level", HL, "High Level" zur Richtigkeitskontrolle, lyophilisierte Humanseren mit Konservierungsmittel, jeweils 1 Flasche. **Die chargenabhängigen Sollwerte bitte den Flaschenetiketten entnehmen!** Vor Gebrauch verdünnen!

[ENZCONJ], Konjugat, Anti-Apo(a)-Fab-Peroxidase, spezifische, polyklonale Fab-Fragmente vom Schaf, lyophilisiert, blau gefärbt, 1 Flasche. Vor Gebrauch verdünnen!

[TMB SUBS], Substratlösung, Enthält Tetramethylbenzidin (TMB), 2 Flaschen, 12 ml, Gebrauchsfertig!

[STOP], Stopplösung, 0,5 M Schwefelsäure, 1 Flasche, 12 ml, Gebrauchsfertig!

Ablebefolien für ELISA-Teststreifen, 2 Stück.

6. Testdurchführung

6.1. Untersuchungsmaterial, Probenlagerung

Humanserum, Citrat- und EDTA-Plasma. Proben sollten zur Lp(a)-Bestimmung möglichst frisch eingesetzt werden. Bei mindestens -20°C können sie mehrere Monate aufbewahrt werden. Die Proben dürfen nicht mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren werden.

Bitte beachten: Eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration und Einfrieren/Auftauen führt zur Aggregatbildung der LDL-Partikel und beeinflusst den Messwert.

6.2. Vorbereitungen

Testkit auf Raumtemperatur bringen (20-26°C).

Herstellen des Verdünnungspuffers, 1+9: Beispiel, 100 ml Pufferkonzentrat+900 ml **Aqua dest.** Gut mischen!

Rekonstituieren der Kalibratoren 1-5 und positiven Kontrollseren: Zu den Kalibratoren und Kontrollseren werden je 200 µl Verdünnungspuffer pipettiert. Anschließend diese 15 Min. stehen lassen und dann 10 s vorsichtig mischen (Probenmischer, ohne Schaumbildung). Nach Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollseren klar bis leicht trüb.

Verdünnen der Kalibratoren, Kontrollseren und Proben, 1+2000:

Um exakte Lp(a)-Werte zu erhalten, ist es von größter Wichtigkeit, die Verdünnungen gut zu mischen. Die Herstellung einer Vorverdünnung ermöglicht genaueres Pipettieren.

Beispiel 1: 10 ml Verdünnungspuffer vorlegen und jeweils 5 µl Kalibratoren, 5 µl Kontrollseren bzw. 5 µl Serum- oder Plasmaproben dazupipettieren. **10 s gut mischen (Probenmischer)!!**

Beispiel 2: Vorverdünnung (1+100); 1000 µl Verdünnungspuffer vorlegen und dazu jeweils 10 µl Kalibratoren, 10 µl Kontrollseren bzw. 10 µl Serum- oder Plasmaproben pipettieren und gut mischen. Endverdünnung (1+2000); 50 µl der Vorverdünnung in 950 µl Verdünnungspuffer weiter verdünnen und gut mischen.

Herstellen der Konjugat-Stammlösung: Zu dem lyophilisierten Konjugat werden 1,3 ml Verdünnungspuffer pipettiert. Anschließend dieses 15 Min. stehen lassen und dann vorsichtig mischen (Blaufärbung).

Herstellen der Konjugat-Gebrauchslösung, 1+10: Beispiel für 8 Testvertiefungen: 100 µl Konjugat-Stammlösung + 1000 µl Verdünnungspuffer. Kurz vor Gebrauch ansetzen! Angesetzte Lösung bei Raumtemperatur (20-26°C) 60 Min. haltbar.

6.3. Stabilitäten

Alle in der Packung enthaltenen Komponenten sind bei 2-8°C ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

Stabilitäten nach Anbruch:

6 Monate bei 2-8°C:

[TMB SUBS], **[MTP]**, **[DILBUF]**

(MTP im Aluminiumbeutel mit Trockenmittel)

2 Monate bei 2-8°C:

Endverdünnter Verdünnungspuffer

2 Wochen bei 2-8°C oder 6 Monate bei -20°C:

Rekonstituierte Kalibratoren 1-5 und Kontrollseren

1 Woche bei 2-8°C oder 6 Monate bei -20°C:

Konjugat-Stammlösung

Testablauf

Proben- und Konjugatinkubation: 100 µl Konjugat-Gebrauchslösung in allen benötigten Testvertiefungen vorlegen. Dazu 100 µl verdünnte Kalibratoren (Teststreifen 1 und 2), verdünnte Kontrollseren und oder verdünnte Proben pipettieren. Teststreifen mit Folie abdecken. Bei Raumtemperatur (20-26°C) 120 Min. inkubieren.

Waschen: Testvertiefungen entleeren und 250 µl Arbeitspuffer pro Testvertiefung einfüllen, absaugen, 2x wiederholen. Auf saugfähiger Unterlage gut ausklopfen.

Substratinkubation: 200 µl Substratlösung pro Testvertiefung pipettieren und 30 Min. bei Raumtemperatur (20-26°C) inkubieren.

Stoppen: 50µl Stopplösung pro Testvertiefung pipettieren, 10 s schütteln und innerhalb 10 Min. bei 450 nm messen (Referenzwellenlänge 650 nm).

7. Hinweise

Gebrauch nur durch Fachpersonal!

Reagenzien verschiedener Chargen dürfen **nicht** kombiniert werden.

Wichtig für Präzision und Richtigkeit:

Hämolytische, lipämische, ikterische oder mikrobiell kontaminierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.

Inkubationstemperatur 20-26°C einhalten.

Einhaltung der Pipettierreihenfolge.

Durchführung von Doppelbestimmungen.

Inkubationszeit $\pm 10\%$ einhalten. Sie beginnt **nach** dem Einpipettieren der letzten Probe.

Einpipettieren der Proben: maximal 60 s pro ELISA-Teststreifen.

Einpipettieren von Konjugat-, Substrat- sowie Stopplösung: maximal 10 s pro ELISA-Teststreifen.

Sicherheitshinweise

Stopplösung (Schwefelsäure) und Bestandteile des Substrats (Methylpyrrolidon) können zu Reizungen der Haut führen. Sollte Säure bzw. TMB in die Augen gelangen, sofort mit viel Wasser auswaschen und Arzt aufsuchen.

Kalibratoren und Kontrollseren sind HBsAg-negativ, HIV-Antikörper- und HCV-Antikörper-negativ. Trotzdem sollten diese Komponenten wie die Proben als potenziell infektiös behandelt werden.

Die Reagenzien enthalten teilweise Konservierungsmittel (z. B. Thimerosal). Nicht schlucken, Haut- und Schleimhautkontakt vermeiden!

Sicherheitsdatenblatt wird auf Anfrage versendet.

Entsorgungshinweise

Bei der Beseitigung der Testpackung sind die nationalen gesetzlichen Bestimmungen in der jeweils aktuellen Fassung zu beachten. Chemikalien und Zubereitungen, die als Reststoffe anfallen, sind in der Regel Sonderabfälle. Besondere Hinweise zur Entsorgung sind zusätzlich im Sicherheitsdatenblatt aufgelistet.

Maßnahmen bei Beschädigung

Im Falle einer erheblichen Beschädigung der Testpackung ist der Hersteller zu benachrichtigen. Falls einzelne Komponenten erheblich beschädigt sind, sind diese nicht zur Testdurchführung zu verwenden. Sie sollten so lange aufbewahrt werden, bis der Transportschaden geregelt ist. Danach sollten sie ordnungsgemäß entsorgt werden.

8. Testauswertung

8.1. Erstellen der Bezugskurve

x-Achse: Konzentration [mg/dl]

y-Achse: Extinktion

Mittelwerte der Messwerte von Kalibratoren, Kontrollseren bzw. Proben bilden.

Bei Verwendung einer Auswertesoftware wird ein Rechenprogramm mit multipler nicht-linearer Regression (z. B. 4-parametrische Kurvenanpassung, Glg. 1) empfohlen.

$$\text{Glg. 1: } Y = d + (a-d)/(1 + (x/c)^b)$$

8.2. Validitätskriterien

Siehe QC-Zertifikat.

8.3. Konzentrationsbestimmung der Proben

Konzentrationen der Proben an der erstellten Bezugskurve ablesen (s. Abb. 1).

Überschreitet die Probenextinktion die Extinktion des Kalibrators 5, muss die Probe mit dem Verdünnungspuffer 1+1 weiterverdünnt werden. Die ermittelte Konzentration wird mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert.

Die Umrechnung von Citrat-Plasmawerten in Serumwerte erfolgt durch Multiplikation der abgelesenen Konzentration mit dem Faktor 1,1.

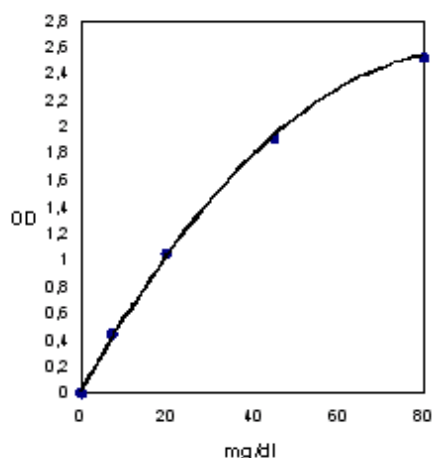


Abbildung 1: Beispiel für eine Bezugskurve

9. Interpretationshilfe

Die Interpretation der Messwerte wird erschwert durch den Einfluss genetischer Faktoren (z. B. Polymorphismus, geschlechtsspezifische und ethnische Unterschiede) sowie durch die asymmetrische Häufigkeitsverteilung der Lp(a) Werte: z. B. liegt der Median für Mitteleuropäer bei ca. 10 mg/dl, für Chinesen bei 7 mg/dl und für Sudanesen bei 40 mg/dl.

Für Mitteleuropäer wurden für 15-20% der Probanden mit einem Plasmaspiegel von ca. 25-30 mg/dl ein erhöhtes arteriosklerotisches Risiko festgestellt.

Die Bewertung der Messergebnisse erfolgt anhand folgender Tabelle:

Beurteilung	Lp(a) [mg/dl]
Normalbereich	<25
Risikobereich	25-35
Pathologischer Bereich	>35

10. Testkenndaten

Intraassayvarianz: Es wurden vier Proben im Konzentrationsbereich von 18-55 mg/dl jeweils 15 mal mit einer Charge in Doppelbestimmung gemessen. Die intraserielle Impräzision betrug bezogen auf die Konzentration zwischen 4% und 6 %.

Interassayvarianz: Es wurden 3 Proben (19,7 mg/dl, 34,6 mg/dl und 59,6 mg/dl) mit einer Charge in 3 Serien in Doppelbestimmung gemessen. Die interserielle Impräzision betrug bezogen auf die Konzentration zwischen 7% und 9%.

Die untere Nachweisgrenze des Tests liegt bei <5 mg/dl. Spezifität der Immunreaktion: Kreuzreaktionen mit Plasminogen und LDL liegen unterhalb der Nachweisgrenze. Die verwendeten Antikörper erfassen alle bekannten Apo(a)-Isoformen.

Standardisierung: Für die Bestimmung von Lp(a) gibt es keine anerkannte Standardmethode und keinen etablierten Standard.

Der Lp(a) ELISA lieferte im Methodenvergleich mit turbidimetrischen Messungen eine gute Korrelation (s. Abbildung 2).

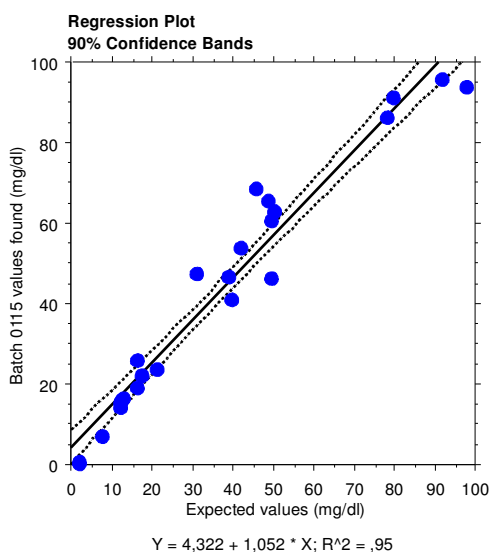


Abbildung 2: Korrelationskurve ELISA/LEIA

11. Weiterführende Literatur

1. Berg, K.: A new serum type system in man - the Lp system; *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **59**, 369-382 (1963)
2. Dagen, M.M., Packard, C.J., Shepherd, J.: A comparison of commercial kits for the measurement of lipoprotein(a); *Ann. Clin. Biochem.* **28**, 359-364 (1991)
3. Dahlen, G.H.: Lipoprotein(a), Atherosclerosis and Thrombosis; *Prog. Lipid. Res.* **30/2+3**, 189-194 (1991)
4. Dahlen, G.H., Guyton, J.R., Attar, M., Farmer, J.A., Kautz, J.A., Gotto, A.M.: Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography; *Circulation* **74**, 758-765 (1986)
5. Eaton, D.L., Fless, G.M., Kohr, W.J., McLean, J.W., Xu, Q-T., Miller, C.G., Lawn, R.M., Scanu, A.M.: Partial amino acid sequence of apolipoprotein(a) shows that it is homologous to plasminogen; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3224-3228 (1987)
6. Edelberg, J.M., Pizzo, S.V.: Lipoprotein(a): The Link Between Impaired Fibrinolysis and Atherosclerosis; *Fibrinolysis* **3**, 135-143 (1991)
7. Kostner, G.M.: Immunochemische Bestimmung von Lipoprotein (a); *Berichte der ÖGKC*, Jg. **15**, 106-108 (1992)
8. Lawn, R.M.: Lipoprotein A und Herzinfarkt; *Spektr. Wiss.* **78** (08/1992)
9. Rhoads, G.G., Dahlen, G., Berg, K., Horton, N.E., Danneberg, A.L.: Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction; *JAMA* **256**, 2540-2544 (1986)
10. Scanu, A.M.: Update on lipoprotein(a); *Curr. Opin. Lipidol.* **2**, 253-258 (1991)
11. Scanu, A.M.: Lipoprotein(a): A Genetic Risk Factor for Premature Coronary Heart Disease; *JAMA* **267/24**, 3326-3329 (1992)
12. Scanu, A.M. and Fless G.M.: Lipoprotein (a), heterogeneity and biological relevance; *J. Clin. Invest.* **85**, 1709-1715 (1990)
13. Steinmetz, A., Utermann, G.: Lipoprotein(a) als Risikofaktor für Arteriosklerose; *Internist* **33**, 24-31 (1992)
14. Utermann, G., Menzel, H.J., Kraft, H.G., Duba, H.C., Kemmler, H.G., Seitz, C.: Lp(a) glycoprotein phenotypes: inheritance and relation to Lp(a) concentrations in plasma; *J. Clin. Invest.* **80**, 458-465 (1987)
15. Utermann, G., Kraft, H.G., Menzel, H.J., Hopferweisse, T., Seitz, C.: Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait. I. Relation of Lp(a) glycoprotein phenotypes to Lp(a) lipoprotein concentrations in plasma; *Hum. Genet.* **78**, 41-46 (1988)

Symbols / Symbole / Symbôles / Símbolos / Símbolos / Σύμβολα

	Cat.-No.: / Kat.-Nr.: / No.- Cat.: / Cat.-No.: / N.º Cat.: / N.-Cat.: / Αριθμός-Κατ.:
	Lot-No.: / Chargen-Bez.: / No. Lot: / Lot-No.: / Lote N.º: / Lotto n.: / Αριθμός -Παραγωγή:
	Use by: / Verwendbar bis: / Utiliser à: / Usado por: / Usar até: / Da utilizzare entro: / Χρησιμοποιείται από:
	No. of Tests: / Kitgröße: / Nb. de Tests: / No. de Determ.: / N.º de Testes: / Quantità dei tests: / Αριθμός εξετάσεων:
	Concentrate / Konzentrat / Concentré / Concentrar / Concentrado / Concentrato / Συμπύκνωμα
	Lyophilized / Lyophilisat / Lyophilisé / Liofilizado / Liofilizado / Liofilizzato / Λυοφιλιασμένο
	In Vitro Diagnostic Medical Device. / In-vitro-Diagnostikum. / Appareil Médical pour Diagnostics In Vitro. / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro. / Equipamento Médico de Diagnóstico In Vitro. / Dispositivo Medico Diagnostico In vitro. / Ιατρική συσκευή για In-Vitro Διάγνωση.
	Evaluation kit. / Nur für Leistungsbewertungszwecke. / Kit pour évaluation. / Juego de Reactivos para Evaluació. / Kit de avaliação. / Kit di evaluazione. / Κιτ Αξιολόγησης.
	Read instructions before use. / Arbeitsanleitung lesen. / Lire la fiche technique avant emploi. / Lea las instrucciones antes de usar. / Ler as instruções antes de usar. / Leggere le istruzioni prima dell'uso. / Διαβάστε τις οδηγίες πριν την χρήση.
	Keep away from heat or direct sun light. / Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. / Garder à l'abri de la chaleur et de toute exposition lumineuse. / Manténgase alejado del calor o la luz solar directa. / Manter longe do calor ou luz solar directa. / Non esporre ai raggi solari. / Να φυλάσσεται μακριά από θερμότητα και άμεση επαφή με το φως του ηλίου.
	Store at: / Lagern bei: / Stocker à: / Almacene a: / Armazenar a: / Conservare a: / Αποθήκευση στους:
	Manufacturer: / Hersteller: / Fabricant: / Productor: / Fabricante: / Fabricante: / Παραγωγός:
	Caution! / Vorsicht! / Attention! / ¡Precaución! / Cuidado! / Attenzione! / Προσοχή!
<p>Symbols of the kit components see MATERIALS SUPPLIED. Die Symbole der Komponenten sind im Kapitel KOMPONENTEN DES KITS beschrieben. Voir MATERIEL FOURNI pour les symbôles des composants du kit. Símbolos de los componentes del juego de reactivos, vea MATERIALES SUMINISTRADOS. Para símbolos dos componentes do kit ver MATERIAIS FORNECIDOS. Per i simboli dei componenti del kit si veda COMPONENTI DEL KIT. Για τα σύμβολα των συστατικών του κιτ συμβουλευτείτε το ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ.</p>	

IBL AFFILIATES WORLDWIDE

	IBL International GmbH Flughafenstr. 52A, D-22335 Hamburg, Germany	Tel.: + 49 (0) 40 532891 -0 Fax: -11 E-MAIL: IBL@IBL-International.com WEB: http://www.IBL-International.com
	IBL Deventer B.V. Zutphenseweg 55, NL-7418 AH Deventer, The Netherlands	Tel.: + 31 570-66 15 15 Fax: -60 73 86 E-MAIL: IBL@IBL-International.com WEB: http://www.IBL-International.com
	IBL - Transatlantic Corp. 288 Wildcat Road, Toronto, Ontario M3J 2N5	Toll free: +1 (866) 645 -6755 Tel.: +1 (416) 645 -1703 Fax: -1704 E-MAIL: IBL@IBL-Transatlantic.com WEB: http://www.IBL-Transatlantic.com

LIABILITY: Complaints will only be accepted in written and if all details of the test performance and results are included (complaint form available from IBL or supplier). Any modification of the test procedure or exchange or mixing of components of different lots could negatively affect the results. These cases invalidate any claim for replacement. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.