

Thiolstatus

Sulphydryl-Status-Test

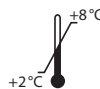
Photometrisches Testsystem zur Bestimmung des gesamten Sulphydryl-Status in Serum, Plasma, Urin und Synovia

Thiol status

Sulphydryl status assay

Photometric assay for the determination of sulphydryl status in serum, plasma, urine and synovia

Gültig ab / Valid from 2022-05-02



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENVORBEREITUNG	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	4
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema</i>	4
8. ERGEBNISSE	5
9. EINSCHRÄNKUNGEN	5
10. QUALITÄTSKONTROLLE	5
<i>Referenzwerte</i>	6
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	6
12. TECHNISCHE MERKMALE	6
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	7
14. LITERATUR	7

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser photometrische Test ist für die Bestimmung des gesamten Sulfhydryl-Status (GSH, proteingebundene und freie SH-Gruppen) in Plasma, Serum, Urin und Synovia geeignet. Für die Auswertung ist ein ELISA-Reader notwendig. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Oxidativer Stress liegt vielen pathophysiologischen Reaktionen zugrunde, z.B. Entzündungsreaktionen, Alterungsprozessen, der diabetischen Angiopathie, postischämischen Gewebeschädigungen sowie der Karzinogenese und Teratogenese. Oxidativer Stress liegt vor, wenn vermehrt Sauerstoffradikale im Körper vorliegen und diese nicht mehr in ausreichender Menge abgebaut werden, weil z.B. die körpereigenen antioxidativen Schutzsysteme überlastet sind. Sauerstoffradikale wirken toxisch, daher ist ihre schnellstmögliche Beseitigung eine wichtige Aufgabe.

Thiole (Sulfhydryle) stellen ein körpereigenes Schutzsystem zur Beseitigung freier Radikale dar. Thiole bzw. Alkanthiole sind organische Verbindungen, die eine oder mehrere funktionelle Thiolgruppen (SH-Gruppen) tragen. Diese reagieren mit freien Radikalen und können daher als „Radikalfänger“ gesehen werden. Ihre Konzentration in der Zirkulation ist ein Maß für den antioxidativen Status eines Organismus. Serum-Thiol-Spiegel charakterisieren außerdem die Fähigkeit, DNA-Schäden zu reparieren, da die enzymatische Aktivität des DNA-Reparatur-Schlüsselenzyms Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) durch das Mengenverhältnis Thiole/Disulfide reguliert wird.

Hohe Thiol-Spiegel werden als Schutz gegenüber freien Radikalen gesehen. Niedrige Thiol-Spiegel gelten als Risikofaktor für DNA-Schädigungen und begünstigen die Entwicklung von Arteriosklerose und Tumorerkrankungen. Chronisch Kranke wiesen in klinischen Studien niedrigere Thiol-Spiegel als gesunde Vergleichspersonen auf. Die Thiol-Spiegel korrelierten außerdem mit dem Grad der Erkrankung (Banne et al. 2003).

Indikationen

- Pankreatitis
- Rheumatoide und reaktive Arthritis
- Systematischer *Lupus erythematoses*
- Sklerodermie, Mischkollagenosen
- Karzinomerkrankungen
- AIDS
- Herzinsuffizienz

- Lungenerkrankungen
- Diabetische Neuropathie

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 1800	PLATE	Mikrotitermodul	12 x 8 Vertiefungen
K 1800	CAL	Kalibrator, lyophilisiert (1000 µmol/l)	4 vials
K 1800	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert	4 vials
K 1800	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert	4 vials
K 1800	REABUF A	Reaktionspuffer A	1 x 24 ml
K 1800	REABUF B	Reaktionspuffer B	1 x 2,4 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Temperiereinheit für 37 °C
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.

- **Vorbereitung des Kalibrators:** Der **lyophilisierter Kalibrator (CAL)** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Er wird vor Gebrauch mit **250 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Er wird zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. Der **Kalibrator** (rekonstituierter CAL) **kann 7 Tage bei -20 °C gelagert werden.**
- **Die lyophilisierten Kontrollen (CTRL 1 und 2)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. CTRL 1 und 2 werden vor Gebrauch mit **250 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. Die **Kontrollen** (rekonstituierte CTRL 1 und CTRL 2) **können 7 Tage bei -20 °C gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- Proben, welche sichtbare Mengen an Feststoff (meist Kryoproteine) enthalten, sollten vor Einsatz im Test zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10000 g) und der resultierende Überstand im Test eingesetzt werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Freie und gebundene SH-Gruppen reagieren in Reaktionspuffer A mit Reaktionspuffer B zu einem gelblichen Farbprodukt mit einem Absorptionsmaximum bei 412 nm.

Die Quantifizierung erfolgt über einen mitgeführten Kalibrator.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Kalibrator/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Je 20 µl Probe, Kalibrator und Kontrollen in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2.	200 µl Reaktionspuffer A (REABUF A) zu jeder Vertiefung hinzugeben.
3.	Messung 1: Messung der Eigenabsorption der Proben im Mikrotiterplattenphotometer bei 405 nm .
4.	20 µl Reaktionspuffer B (REABUF B) zu jeder Vertiefung hinzugeben.
5.	30 min bei 37 °C inkubieren (mit Folie abdecken).
6.	Messung 2 erfolgt sofort nach der Inkubation bei 405 nm im Mikrotiterplattenphotometer.

8. ERGEBNISSE

Die Differenz aus Messung 1 und 2 ist proportional dem Sulfhydryl-Status der Probe. Zur Auswertung werden die OD-Werte der Messung 1 von den OD-Werten der Messung 2 subtrahiert. Proben und Kontrollen werden dann mittels des Kalibrators berechnet:

$$\text{Probenkonzentration } [\mu\text{mol/l}] = \frac{\Delta\text{OD} \times \text{Kalibratorkonzentration } [\mu\text{mol/l}]}{\Delta\text{OD Kalibrator}}$$

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Vollblut ist nicht für die Messung geeignet.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Serum und Plasma: 430–660 $\mu\text{mol/l}$ (2 SD)

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.












13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

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

14. LITERATUR

1. Banne, A.F., Amiri, A. & Pero, R.W., 2003. Reduced level of serum thiols in patients with a diagnosis of active disease. *Journal of anti-aging medicine*, **6**(4), pp.327–34.
2. Belch, J.J. et al., 1991. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *British heart journal*, **65**(5), pp.245–8.
3. Himmelfarb, J. et al., 2004. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, **15**(9), pp.2449–56.

Verwendete Symbole:

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

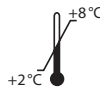
Thiol status

Sulphydryl status assay

***Photometric assay for the determination of sulphydryl status
in serum, plasma, urine and synovia***

Valid from 2022-05-02

REF K 1800



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	11
2. INTRODUCTION	11
3. MATERIAL SUPPLIED	11
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	12
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	12
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	13
7. ASSAY PROCEDURE	13
<i>Principle of the test</i>	13
<i>Test procedure</i>	13
8. RESULTS	14
9. LIMITATIONS	14
10. QUALITY CONTROL	14
<i>Reference range</i>	14
11. PRECAUTIONS	14
12. TECHNICAL HINTS	15
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	15
14. REFERENCES	15

1. INTENDED USE

This photometric assay is suitable for the determination of the thiol (sulfhydryl) status (GSH, protein bound and free SH groups) in plasma, serum, urine and synovia. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Oxidative stress, or the production of oxygen-centered free radicals, has been hypothesised as the major source of DNA damage that in turn can lead to altered genetic expression, disease, and ageing of humans.

Serum protein thiol levels in blood are a direct measure of the *in vivo* reduction/oxidation (redox) status in humans, because thiols react readily with oxygen-containing free radicals to form disulfides. Moreover, serum thiols also reflect DNA repair capacity and the possible eventual accumulation of genetic damage, since a key DNA repair enzyme, poly ADP-ribose polymerase (PARP), is thiol/disulfide redox regulated.

Serum protein thiols can possibly be used to estimate individual ageing status. Data from Banne et al. (2003) strongly confirm an important role of oxidative stress in human disease development, and identify serum thiol status as a potential biochemical endpoint useful in the assessment of aging.

Indications

- Pancreatitis
- Rheumatoid and reactive arthritis
- Systemic *Lupus erythematoses*
- Scleroderma, mixed connective tissue disease
- Carcinomas
- AIDS
- Heart failure
- Lung diseases
- Diabetic neuropathy

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 1800	PLATE	Microtiter plate	12 x 8 wells
K 1800	CAL	Calibrator, lyophilised (1000 µmol/l)	4 vials
K 1800	CTRL 1	Control, lyophilised	4 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 1800	CTRL 2	Control, lyophilised	4 vials
K 1800	REABUF A	Reaction buffer A	1 x 24 ml
K 1800	REABUF B	Reaction buffer B	1 x 2,4 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1 000 µl tips
- Incubation chamber for 37 °C
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the calibrator:** The **lyophilised calibrator (CAL)** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CAL has to be reconstituted with **250 µl of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. The **calibrator** (reconstituted CAL) **can be stored at -20 °C for 7 days.**
- **The lyophilised controls 1 and 2 (CTRL 1 and 2)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CTRLs have to be reconstituted with each **250 µl of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. The **controls 1 and 2** (reconstituted CTRL 1 and 2) **can be stored at -20 °C for 7 days.**

- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

- Lipaemia and haemolysis interfere with the test system. Such samples should not be measured.
- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged (5 min at 10 000 *g*) prior to measurement and the resulting supernatant is used in the test.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

When the sample is added to the reaction buffer A together with the reaction buffer B, free and bound SH groups from the sample undergo a reaction, that results in a yellow colored product with an absorption maximum at 412 nm. The quantitation is performed by the delivered calibrator.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of calibrator/sample/controls on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Pipet 20 µl of sample, calibrator and controls in the corresponding wells.
2.	Add 200 µl reaction buffer A (REABUF A).
3.	Measurement 1: read the absorption of the samples in the microtiter plate reader at 405 nm .
4.	Add 20 µl reaction buffer B (REABUF B).
5.	Incubate for 30 min at 37 °C (seal the cavities with plastic foil).
6.	Measurement 2 is performed immediately after the incubation at 405 nm in the microtiter plate reader.

8. RESULTS

The difference between measurement 1 and 2 is directly proportional to the thiol- (sulfhydryl) status of the sample. For evaluation, the optical densities of measurement 1 are subtracted from the optical densities of measurement 2.

Samples and controls are then calculated by the use of the calibrator:

$$\text{Sample concentration } [\mu\text{mol/l}] = \frac{\Delta\text{OD} \times \text{calibrator concentration } [\mu\text{mol/l}]}{\Delta\text{OD calibrator}}$$

9. LIMITATIONS

Whole blood is not suited for this test.

10. QUALITY CONTROL

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

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

Reference range

Serum and plasma: 430–660 $\mu\text{mol/l}$ (2 SD)

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

12. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.












13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

14. REFERENCES

1. Banne, A.F., Amiri, A. & Pero, R.W., 2003. Reduced level of serum thiols in patients with a diagnosis of active disease. *Journal of anti-aging medicine*, **6**(4), pp.327–34.
2. Belch, J.J. et al., 1991. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *British heart journal*, **65**(5), pp.245–8.
3. Himmelfarb, J. et al., 2004. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, **15**(9), pp.2449–56.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		