

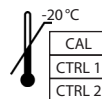
# PerOx (TOS/TOC) Kit

**Photometrisches Testsystem zur Bestimmung des gesamten oxidativen Status/Kapazität (TOS/TOC) EDTA-Plasma, Serum und anderen biologischen Proben**

**Photometric test system for the determination of the total oxidative status/capacity (TOS/TOC) in EDTA plasma, serum and other biological samples**

Gültig ab / Valid from 2022-12-05

**REF** KC5100



**IVD** **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

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



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>3</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<i>Kalibrator und Kontrollen</i>	4
<i>Lagerung der übrigen Reagenzien</i>	4
<i>Vorbereitung der Reaktionspuffermischung</i>	4
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>5</b>
<i>EDTA-Plasma und Serum</i>	5
<i>Zellkultur</i>	5
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Testdurchführung</i>	6
<b>8. AUSWERTUNG</b>	<b>6</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>7</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>7</b>
<i>Referenzbereiche</i>	7
<i>Kontrollen</i>	8
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>8</b>
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Nachweisgrenze</i>	8
<i>Linearität</i>	8
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>9</b>
<b>13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>9</b>
<b>14. LITERATUR</b>	<b>10</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser photometrische Test ist für die Bestimmung des gesamten oxidativen Status/ Kapazität (TOS, total oxidative status bzw. TOC, total oxidative capacity) in EDTA-Plasma, Serum und Zellkulturüberständen geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Eine Überproduktion von Sauerstoffradikalen oder unzureichende antioxidative Abwehrmechanismen führen im Organismus zu einem gefährlichen Ungleichgewicht. Durch dieses Ungleichgewicht werden Pathomechanismen in Gang gesetzt, die mittel- oder unmittelbar Verursacher für eine Vielzahl von Krankheiten sind. Zu nennen wären hier an erster Stelle die kardiovaskulären Erkrankungen und die Arteriosklerose. Aber auch die Beteiligung an Entzündungsvorgängen, Sepsis, Karzinogenese und neurodegenerativen Prozessen ist augenscheinlich und kausativ.

Diese Befunde sind mit ein Grund, weshalb die Bestimmung des **oxidativen Status/oxidativen Stress** für die heutige medizinische Diagnostik und Forschung von grundlegender Bedeutung ist. Die bisher eingesetzten Methoden, um die radikalvermittelten Effekte wie z.B. Lipidperoxidation zu erfassen, sind zum Teil sehr aufwändig (HPLC) oder weisen nur Abbauprodukte mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach (z.B. TBARS).

Der **PerOx**-Assay hingegen ist schnell und einfach abzuarbeiten und erfasst die **gesamten Lipidperoxide**. Da eine direkte Korrelation zwischen freien Radikalen und Lipidperoxiden besteht, kann damit der **oxidative Status/oxidative Stress** in biologischen Proben festgelegt und charakterisiert werden.

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 0005.15	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 ml
KC5100	CAL	Kalibrator; lyophilisiert (Konzentration siehe Spezifikationsdatenblatt)	4 x
	CTRL1	Kontrolle 1; lyophilisiert	4 x
	CTRL2	Kontrolle 2; lyophilisiert	4 x
	REABUFA	Reaktionspuffer A	25 ml
	REABUFB	Reaktionspuffer B	1 ml
	ENZ	Enzymlösung	50 µl
	STOP	Stopplösung	15 ml
	PLATE	Mikrotitermodul	1 x

Neben den kompletten Kits können auch alle Komponenten einzeln bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex-Wirbelmischer
- Diverse Pipetten
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)
- 37°C-Temperiereinheit

## 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

### *Kalibrator und Kontrollen*

Der **lyophilisierte Kalibrator** (CAL) und die **lyophilisierten Kontrollen 1 und 2** (CTRL1 und CTRL2) sind bei **-20°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.

Vor Gebrauch werden sie mit je **250 µl Rekonstitutionslösung** (RECSOL) resuspendiert, zum Lösen 5 min stehengelassen und dann mittels Vortex-Wirbelmischer homogenisiert. Aliquots des **Kalibrators** (resuspendierter CAL) und der **Kontrollen 1 und 2** (resuspendierte CTRL1 und CTRL2) sind bei **-20°C** für **4 Wochen** stabil. **Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.** Die Konzentration des Kalibrators und der Kontrollen ändert sich geringfügig von Charge zu Charge. Der genaue Gehalt ist den entsprechenden Produktspezifikationen zu entnehmen.

### *Lagerung der übrigen Reagenzien*

Der Reaktionspuffer B (REABUFB) ist bei **2–8°C lichtgeschützt** aufzubewahren.

Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

### *Vorbereitung der Reaktionspuffermischung*

Die Enzymlösung (ENZ) sollte vor Benutzung kurz zentrifugiert werden, um evtl. am Deckel haftende Flüssigkeit nicht zu verlieren. Die Enzymlösung (ENZ) muss nach Gebrauch wieder mit Dichtfilm (z. B. Parafilm) verschlossen werden, um Evaporation und Kontamination zu vermeiden.

Um die Funktionalität der **Reaktionspuffermischung** zu gewährleisten, wird die Herstellung in lichtgeschützten Behältern (beispielsweise Braunglas) empfohlen.

Die **Reaktionspuffermischung** wird unmittelbar vor Testansatz wie folgt hergestellt:

- 5 ml** Reaktionspuffer A (REABUFA)
- + **100 µl** Reaktionspuffer B (REABUFB)
- + **5 µl** Enzymlösung (ENZ)

**Wichtig:** Die Angaben sind ausreichend für die Durchführung von 40 Bestimmungen und dienen als Richtwerte, die an die jeweilige Probenanzahl anzupassen sind.

**Wichtig:** Die Reaktionspuffermischung **kann nicht aufbewahrt werden.** Die Reaktionspuffer (REABUFA, REABUFB) und die Enzymlösung (ENZ) sind bei 2–8°C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### *EDTA-Plasma und Serum*

Als Probe eignet sich venöses Nüchternblut. EDTA-Plasma ist vorzuziehen, da es bei Serum zu einer zeitabhängigen Zunahme der Peroxidkonzentration kommt. EDTA-Plasma ist bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen stabil.

Bei der Serumprobengewinnung ist zu beachten, dass bei Serum die Gerinnungszeit von 30 min bei Zimmertemperatur nicht überschritten wird. Anschließend müssen die Seren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Messung gelagert werden.

Proben, welche sichtbare Mengen an Feststoff (meist Kryoproteine) enthalten, sollten vor Einsatz im PerOx-Test zentrifugiert werden (mindestens 5 min bei 10 000 g) und der resultierende Überstand im Test eingesetzt werden.

### *Zellkultur*

Prinzipiell ist es möglich, den PerOx-Spiegel in Zellkulturüberständen zu bestimmen, eine Überprüfung des Zellkulturmediums auf störende Substanzen ist jedoch nötig. Hierzu empfehlen wir folgende Vorgehensweise:

- $10\ \mu\text{l}$  eines 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrats mit  $1\ 000\ \mu\text{l}$  Reaktionspuffer A (REABUFA) verdünnen =  $S_0$
- $5\ \mu\text{l}$  der Lösung  $S_0$  mit  $1\ 000\ \mu\text{l}$  Reaktionspuffer A (REABUFA) verdünnen =  $S_1$
- Ansatz 1:  $10\ \mu\text{l}$  Zellkulturmedium in Kavität pipettieren
- Ansatz 2:  $10\ \mu\text{l}$  Rekonstitutionslösung (RECSOL) in andere Kavität pipettieren
- Jeweils  $10\ \mu\text{l}$   $S_1$  zu beiden Ansätzen geben, anschließend  $100\ \mu\text{l}$  Reaktionspuffer A (REABUF A) und  $100\ \mu\text{l}$  Reaktionspuffermischung (Herstellung siehe vorne) pipettieren. Nach 5 min Stopplösung (STOP) zugeben und sofort bei  $450\ \text{nm}$  im Mikrotiterplattenphotometer messen.

### **Beurteilung der Zellkulturmedium-Resultate**

Ab einem Verhältnis  $\text{OD}_{\text{Ansatz 1}} : \text{OD}_{\text{Ansatz 2}} > 0,8$  sind keine gravierenden Störfaktoren vorhanden und der Test kann durchgeführt werden.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### Testprinzip

Die Bestimmung der Peroxide erfolgt über eine Reaktion von Peroxidase mit Peroxid und einer anschließenden Substratumsetzung mit TMB.

Nach Zugabe der Stopplösung wird die chromogene Flüssigkeit bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen. Die Quantifizierung erfolgt über einen mitgeführten Kalibrator.

### Testdurchführung

#### Arbeitsschema

Die Mikrotiterplatte ist gebrauchsfertig.

**Wichtig:** Die angegebene Temperatur und Inkubationsdauer ist exakt einzuhalten, um die Reproduzierbarkeit der Messwerte gewährleisten zu können.

1.	<b>10 µl</b> Probe, Kalibrator, Kontrollen und Leerwert/Rekonstitutionslösung (RECSOL) in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2.	<b>100 µl</b> Reaktionspuffer A (REABUFA) hinzugeben.
3.	<b>Messung 1:</b> Messung der Eigenabsorption der Proben im ELISA-Reader bei 450 nm.
4.	<b>100 µl</b> Reaktionspuffermischung hinzugeben.
5.	<b>15 min</b> bei <b>37 °C</b> inkubieren.
6.	<b>50 µl</b> Stopplösung (STOP) hinzugeben.
7.	<b>Messung 2</b> erfolgt sofort nach Zugabe der Stopplösung (STOP) bei 450 nm im ELISA-Reader.

## 8. AUSWERTUNG

Die Differenz aus Messung 1 und 2 ist proportional dem Peroxidgehalt der Probe.

Zur Auswertung werden die gemessenen OD-Werte der ersten Messung von den OD-Werten der zweiten Messung subtrahiert. So erhält man die  $\Delta OD$ -Werte von Probe, Kalibrator, Kontrollen und Leerwert.

Die Konzentrationen für Proben und Kontrollen werden dann am Kalibrator (Konzentration siehe Produktspezifikation) mit folgender Formel berechnet:

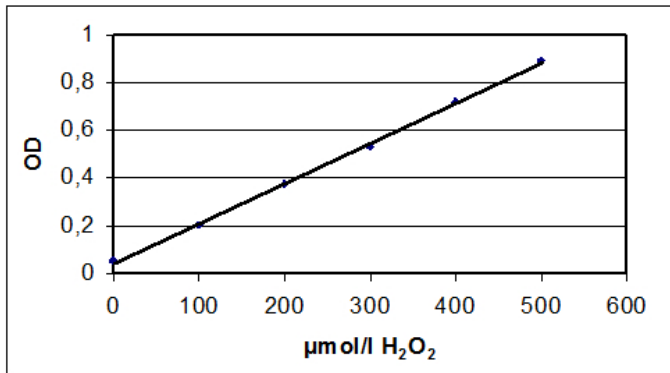


$$\text{Konz. Probe } [\mu\text{mol/l}] = \frac{\Delta\text{OD Probe} - \Delta\text{OD Leerwert}}{\Delta\text{OD Kalibrator} - \Delta\text{OD Leerwert}} \times \text{Konz. Kalibrator } [\mu\text{mol/l}]^*$$

\* Konzentration siehe Produktspezifikation

Eine vorgefertigte Excel-Auswertungsdatei kann auf Anfrage bei Immundiagnostik AG bezogen werden.

Die folgende Mustereichgerade dient lediglich der Anschauung. Da die Reaktion im gewählten Konzentrationsbereich linear verläuft, kann eine Einpunktkalibrierung mittels des beigefügten Kalibrators als ausreichend erachtet werden.



## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Die Verwendung von Heparin-Plasma führt zu Eintrübungen des Ansatzes und damit zu falschen Messergebnissen. Stark hämolytische sowie lipämische Proben zeigen vielfach pathologische Peroxid-Konzentrationen. Wir raten daher von der Messung solcher Proben ab. Vollblut ist nicht für die Messung geeignet.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

### Referenzbereiche

#### EDTA-Plasma

< 200 µmol/l	gut
200–350 µmol/l	mäßige oxidative Belastung
> 350 µmol/l	starke oxidative Belastung

**Serum**

< 180 µmol/l	gut
180–310 µmol/l	mäßige oxidative Belastung
> 310 µmol/l	starke oxidative Belastung

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren, da Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe der Referenzbereiche dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

**Kontrollen**

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.

**11. TESTCHARAKTERISTIKA****Präzision und Reproduzierbarkeit****Intra-Assay-VK**

2,94 % (162 µmol/l) [n = 6]

**Inter-Assay-VK**

6,63 % (136 µmol/l) [n = 10]

6,85 % (389 µmol/l) [n = 10]

**Nachweisgrenze**

7 µmol/l

**Linearität**

bis 800 µmol/l

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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 potentiellinfektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.

## 13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST




- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.
- Schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 14. LITERATUR

- Hildebrandt, W. et al., 2002. Effect of N-acetyl-cysteine on the hypoxic ventilatory response and erythropoietin production: linkage between plasma thiol redox state and O(2) chemosensitivity. *Blood*, **99**(5), pp.1552–5.
- Reichenbach, J. et al., 2002. Elevated oxidative stress in patients with ataxia telangiectasia. *Antioxidants & redox signaling*, **4**(3), pp.465–9.
- Schimke, I. et al., 2001. Decreased oxidative stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy one year after immunoglobulin adsorption. *Journal of the American College of Cardiology*, (1), pp.178–83.

**Verwendete Symbole:**

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmoderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	Herstellungskennung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

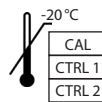
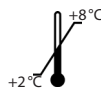
# PerOx (TOS/TOC) Kit

*Photometric test system for the determination of the total oxidative status/capacity (TOS/TOC) in EDTA plasma, serum and other biological samples*

Valid from 2022-12-05



KC5100



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

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

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>14</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>15</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>15</b>
<i>Calibrator and controls</i>	15
<i>Storage of the other reagents</i>	15
<i>Preparation of the reaction buffer mixture</i>	15
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>16</b>
<i>EDTA plasma and serum</i>	16
<i>Cell culture</i>	16
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>17</b>
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	17
<b>8. RESULTS</b>	<b>17</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>18</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>18</b>
<i>Reference ranges</i>	18
<i>Controls</i>	19
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>19</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	19
<i>Linearity</i>	19
<i>Detection limit</i>	19
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>20</b>
<b>13. GENERAL NOTES ON THE TEST</b>	<b>20</b>
<b>14. REFERENCES</b>	<b>21</b>

## 1. INTENDED USE

This photometric Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of the total oxidative status/capacity (TOS/TOC) in EDTA plasma, serum and cell culture supernatants. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

An overproduction of oxygen radicals or insufficient antioxidative capacity leads to a dangerous imbalance in the organism. This starts pathological mechanisms which develop several diseases. The most important disease is the cardiovascular arteriosclerosis. Beside this inflammation processes, sepsis, cancerogenesis and neurodegenerative diseases are postulated.

This is the reason why the determination of the **oxidative status/oxidative stress** is of fundamental importance in medical diagnosis and in research. The methods used for measurement of radical-linked effects (lipid peroxidation) up to now are very time consuming (HPLC) or reflect only breakdown products of multiple unsaturated fatty acids (TBARS).

The **PerOx** assay is fast, reliable and easy to perform. **Total lipid peroxides** are measured. Because of a direct correlation between oxygen radicals and lipid peroxides, it is possible to measure and characterize the **oxidative status/oxidative stress** in biological fluids.

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 0005.15	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml
KC5100	CAL	Calibrator; lyophilised (see specification data sheet for concentration)	4 x
	CTRL1	Control 1; lyophilised	4 x
	CTRL2	Control 2; lyophilised	4 x
	REABUFA	Reaction buffer A	25 ml
	REABUFB	Reaction buffer B	1 ml
	ENZ	Enzyme solution	50 µl
	STOP	Stop solution	15 ml
	PLATE	Microtiter plate	1 x

Individual components can be ordered separately from Immundiagnostik. Please ask for the price list of the individual components.



## 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Vortex
- Various pipettes
- Incubation chamber for 37 °C
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

## 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

### *Calibrator and controls*

The **lyophilised calibrator** (CAL) and the **lyophilised controls 1 and 2** (CTRL1 and CTRL2) are stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, they have to be reconstituted with each **250 µl reconstitution solution** (RECSOL). Allow the vial content to dissolve for 5 min and then mix thoroughly by vortexing. Aliquots of the **calibrator** (reconstituted CAL) and the **controls 1 and 2** (reconstituted CTRL1 and CTRL2) can be stored at **-20 °C** for **4 weeks**. **Avoid repeated thawing and freezing**. The concentration of calibrator and controls slightly changes from lot to lot. The exact concentration is stated in the respective product specifications.

### *Storage of the other reagents*

Reaction buffer B (REABUFB) has to be stored at **2–8 °C in the dark**.

Test reagents are stable until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**.

### *Preparation of the reaction buffer mixture*

To avoid losses, the enzyme solution (ENZ) should be centrifuged prior to use. After use, the vial has to be tightly closed to avoid contamination or evaporation (e.g. with parafilm).

In order to ensure the functionality of the **reaction buffer mixture**, preparation in light-protected containers (eg brown glass) is recommended.

The **reaction buffer mixture** must be prepared directly before use:

- **5 ml** reaction buffer A (REABUFA)
- **+ 100 µl** reaction buffer B (REABUFB)
- **+ 5 µl** enzyme solution (ENZ)

**Important:** The amounts mentioned above are sufficient for 40 tests. For other sample numbers, the buffer volumes must be adjusted accordingly.

**Important:** The reaction buffer mixture **cannot be stored**. The reaction buffers (REABUFA, REABUFB) and the enzyme solution (ENZ) are stable at 2–8°C until the expiry date stated on the label.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *EDTA plasma and serum*

Venous fasting blood is suited for this test system. EDTA plasma should be preferred because in serum, a time dependent increase in peroxide concentration is observed. EDTA plasma is stable at -20°C for at least 4 weeks.

During serum preparation, it is important not to exceed 30 min at room temperature for clotting. Afterwards, the serum should be stored at -20°C up to the measurement. Samples with visible amounts of precipitates (mostly cryoproteins) should be centrifuged (at least 5 min at 10 000 g) prior to measurement. The supernatant is used in the test.

### *Cell culture*

In principle, it is possible to determine the PerOx concentration in cell culture supernatants. To test whether ingredients of the cell culture medium affect the measurement or not, we recommend the following approach:

- Dilute 10 µl of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrate with 1 000 µl of reaction buffer A (REABUF A) = S<sub>0</sub>.
- Dilute 5 µl of S<sub>0</sub> with 1 000 µl of reaction buffer A (REABUF A) = S<sub>1</sub>
- Preparation 1: Pipet 10 µl cell culture medium into one well.
- Preparation 2: Pipet 10 µl reconstitution solution (RECSOL) into another well.
- Add each 10 µl S<sub>1</sub> to both preparations, then add each 100 µl reaction buffer A (REABUF A) and 100 µl reaction buffer mixture (see preparation above). Incubate for 5 min. Add 50 µl stop solution (STOP) and measure immediately at 450 nm in a microtiter plate reader.

### **Evaluation of the cell culture medium results**

A ratio of OD<sub>preparation 1</sub> : OD<sub>preparation 2</sub> > 0,8 demonstrates that there are no major disturbing factors in the tested cell medium, and the assay can be performed.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

The determination of the peroxides is performed by the reaction of a peroxidase with peroxides in the sample followed by the conversion of TMB to a colored product.

After addition of a stop solution the samples are measured at 450 nm in a microtiter plate reader. The quantification is performed by the delivered calibrator.

### *Test procedure*

The microtiter plate is ready to use.

**Important:** To ensure the reproducibility of the measurement, the given incubation time and temperature must strictly be followed.

1.	Pipet <b>10 µl</b> of sample, calibrator (CAL), controls (CTRL1, CTRL2) and blank/reconstitution solution (RECSOL) in appropriate wells.
2.	Add <b>100 µl</b> of reaction buffer A (REABUF A).
3.	<b>Measurement 1:</b> Read the absorption of the samples in the ELISA reader at 450 nm.
4.	Add <b>100 µl</b> of reaction buffer mixture.
5.	Incubate for <b>15 min</b> at <b>37 °C</b> .
6.	Add <b>50 µl</b> stop solution (STOP).
7.	<b>Measurement 2</b> is performed immediately after addition of the stop solution (STOP) at 450 nm in the ELISA reader.

## 8. RESULTS

The difference between measurement 1 and 2 is directly proportional to the peroxide content of the sample:

For evaluation, the estimated OD values of the first measurement are subtracted from the optical densities of the second measurement to obtain the  $\Delta OD$  values of sample, calibrator, controls and blank.

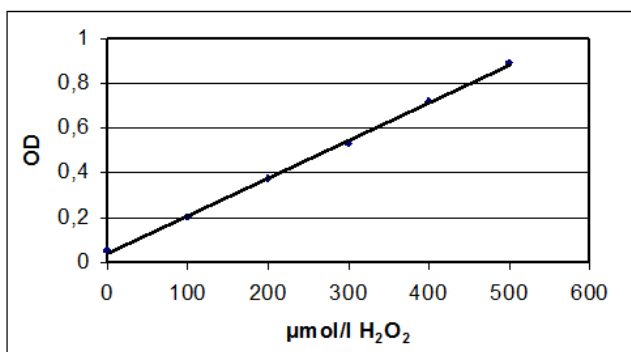
The concentrations of samples and controls are calculated using the calibrator (see product specification) and the following formula:

$$\text{Sample conc. } [\mu\text{mol/l}] = \frac{\Delta\text{OD sample} - \Delta\text{OD blank}}{\Delta\text{OD calibrator} - \Delta\text{OD blank}} \times \text{conc. calibrator } [\mu\text{mol/l}]^*$$

\* see product specification for concentration

A prepared Excel evaluation file can be requested by Immundiagnostik AG.

The following linear standard curve is for demonstrational purpose only. Because of the linearity in the chosen concentration range, one-point calibration using the included calibrator is sufficient.



## 9. LIMITATIONS

Whole blood cannot be used.

Strong haemolytic and lipaemic samples often show pathological concentrations. We do not recommend analysis of such samples.

The use of heparin plasma results in wrong results. Therefore, heparin plasma cannot be used in this assay.

## 10. QUALITY CONTROL

### Reference ranges

#### EDTA-plasma

< 200 μmol/l	low oxidative stress
200–350 μmol/l	moderate oxidative stress
> 350 μmol/l	high oxidative stress

**Serum**

< 180 µmol/l	low oxidative stress
180–310 µmol/l	moderate oxidative stress
> 310 µmol/l	high oxidative stress

We recommend each laboratory to establish its own reference ranges. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

**Controls**

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.

**11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS***Precision and reproducibility***Intra-assay CV**

2.94 % (162 µmol/l) [n = 6]

**Inter-assay CV**

6.63 % (136 µmol/l) [n = 10]

6.85 % (389 µmol/l) [n = 10]

*Linearity*

up to 800 µmol/l

*Detection limit*

7 µmol/l

## 12. PRECAUTIONS

- 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.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid ( $H_2SO_4$ ), a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic color reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.

## 13. GENERAL NOTES ON THE TEST

















- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Plugs and caps of different reagents should not be swapped.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Control samples should be analyzed with each run.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immunodiagnostik AG along with a written complaint.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

- 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.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

## 14. REFERENCES

1. Hildebrandt, W. et al., 2002. Effect of N-acetyl-cysteine on the hypoxic ventilatory response and erythropoietin production: linkage between plasma thiol redox state and O(2) chemosensitivity. *Blood*, **99**(5), pp.1552–5.
2. Reichenbach, J. et al., 2002. Elevated oxidative stress in patients with ataxia telangiectasia. *Antioxidants & redox signaling*, **4**(3), pp.465–9.
3. Schimke, I. et al., 2001. Decreased oxidative stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy one year after immunoglobulin adsorption. *Journal of the American College of Cardiology*, (1), pp.178–83.

### 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
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin

## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

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

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

