

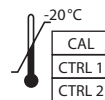
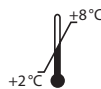
ImAnOx[®] (TAS/TAC) Kit

Photometrisches Testsystem zur Bestimmung des gesamten antioxidativen Status/Kapazität (TAS/TAC) in Serum und EDTA-Plasma

Photometric test system for the determination of the total antioxidative status/capacity (TAS/TAC) in serum and EDTA-plasma

Gültig ab / Valid from 2021-06-23

REF **KC5200**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

| | |
|---|----------|
| 1. VERWENDUNGSZWECK | 2 |
| 2. EINLEITUNG | 2 |
| 3. INHALT DER TESTPACKUNG | 2 |
| 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL | 3 |
| 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN | 3 |
| <i>Kalibrator und Kontrollen</i> | 3 |
| <i>Lagerung der übrigen Reagenzien</i> | 3 |
| <i>Vorbereitung von Reagenz 1</i> | 3 |
| <i>Vorbereitung von Reagenz 2</i> | 4 |
| 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG | 4 |
| 7. TESTDURCHFÜHRUNG | 5 |
| <i>Testprinzip</i> | 5 |
| <i>Pipettierschema</i> | 5 |
| 8. ERGEBNISSE | 6 |
| 9. EINSCHRÄNKUNGEN | 7 |
| 10. QUALITÄTSKONTROLLE | 7 |
| <i>Referenzwerte</i> | 7 |
| 11. TESTCHARAKTERISTIKA | 8 |
| <i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i> | 8 |
| <i>Analytische Sensitivität</i> | 8 |
| 12. VORSICHTSMASSNAHMEN | 8 |
| 13. TECHNISCHE MERKMALE | 9 |
| 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 9 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser photometrische Test ist für die Bestimmung des gesamten antioxidativen Status/Kapazität (TAS, total antioxidative status bzw. TAC, total antioxidative capacity) in Serum und EDTA-Plasma 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 Antioxidative-Kapazitäts-Assay hingegen ist schnell und einfach abzarbeiten und erfasst die gesamte antioxidative Kapazität einer Probe.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|-----------|----------------|--|-----------------|
| KC5200 | PLATE | Mikrotitermodul | 2 Stück |
| KC5200 | CAL | Kalibrator, lyophilisiert (250 µl) | 3 Fläschchen |
| KC5200 | CTRL1 CTRL2 | Kontrolle 1 und 2, lyophilisiert (250 µl) | 2x 3 Fläschchen |
| KC5200 | PER | Peroxidlösung | 250 µl |
| KC5200 | REABUF A | Reaktionspuffer A | 105 ml |
| KC5200 | REABUF B | Reaktionspuffer B | 1,5 ml |
| KC5200 | ENZ | Enzymlösung | 50 µl |
| KC5200 | STOP | Stopplösung | 15 ml |
| K 0005.15 | RECSOL | Rekonstitutionslösung | 15 ml |

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

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex-Wirbelmischer
- diverse Pipetten
- Mikrotiterplattenphotometer
- Temperiereinheit für 37°C

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 auf dem Etikett des CAL angegeben bzw. der Kontrollspezifikation zu entnehmen.

Lagerung der übrigen Reagenzien

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

Vorbereitung von Reagenz 1

Um die Funktionalität von Reagenz 1 zu gewährleisten, ist bei der Herstellung auf die Verwendung von lichtgeschützten Behältern (beispielsweise Braunglas) zu achten.

Zur Herstellung des Reagenz 1 wird unmittelbar vor Gebrauch Peroxidlösung (PER) in Reaktionspuffer A (REABUF A) verdünnt. Zum Beispiel:

5 ml Reaktionspuffer A (REABUF A) + 10 µl Peroxidlösung (PER) = Vorverdünnung
100 µl Vorverdünnung + 4,9 ml Reaktionspuffer A (REABUF A) = **Reagenz 1**

Reagenz 1 ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden.

Wichtig: Die Angaben sind ausreichend für die Durchführung von 50 Bestimmungen und dienen als Richtwerte, die an die jeweilige Probenanzahl anzupassen sind.

Vorbereitung von Reagenz 2

Um die Funktionalität von Reagenz 2 zu gewährleisten, ist bei der Herstellung auf die Verwendung von lichtgeschützten Behältern (beispielsweise Braunglas) zu achten.

Aufgrund von Eigenabsorption und der während der Inkubation durch Wasserstoffperoxid gebildeten, bei 450 nm absorbierenden Reaktionsprodukte ist es notwendig, die Messung **mit und ohne Zugabe von Enzym** durchzuführen.

Zur Herstellung des **Reagenz 2** werden **unmittelbar vor Gebrauch** Reaktionspuffer A (REABUF A) und Reaktionspuffer B (REABUF B) gemischt, einmal mit und einmal ohne Zugabe von Enzymlösung (ENZ).

Zum Beispiel:

Reagenz 2a: 5 ml Reaktionspuffer A (REABUF A) + 100 µl Reaktionspuffer B (REABUF B)
+ 5 µl Enzymlösung (ENZ) = **Reagenz 2a mit Enzymlösung**

Reagenz 2b: 5 ml Reaktionspuffer A (REABUF A) + 100 µl Reaktionspuffer B (REABUF B)
= **Reagenz 2b ohne Enzymlösung**

Reagenz 2a mit und Reagenz 2b ohne Zugabe von Enzymlösung sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.

Wichtig: 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.

Wichtig: Die Angaben sind ausreichend für die Durchführung von 50 Bestimmungen und dienen als Richtwerte, die an die jeweilige Probenanzahl anzupassen sind.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Als Probe eignen sich Serum und EDTA-Plasma aus venösem Nüchternblut.

Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.

Lagerung

Die Probe kann als Vollblut bei 2–8 °C innerhalb von 24 Stunden versendet werden. Anschließend müssen die Seren bzw. Plasmen bei -20 °C bis zur Messung gelagert werden. Die Proben können bis zu 4 Wochen bei -20 °C gelagert werden.

Vorbereitung

Proben, die sichtbare Mengen an Feststoff (meist Kryoproteine) enthalten, sollten vor Einsatz im Assay zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10.000 g) und der resultierende Überstand im Test eingesetzt werden.

Für eine Bestimmung in Doppelwerten werden **4 x je 10 µl** jeder vorbereiteten Probe im Test eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser photometrische Test dient zur quantitativen Bestimmung vom gesamten antioxidativen Status/Kapazität (TAS/TAC) in Serum und EDTA-Plasma.

Die Bestimmung der Antioxidantien erfolgt über eine Reaktion einer definierten Menge exogenen Peroxids (H₂O₂) mit den in der Probe vorliegenden Antioxidantien über einen bestimmten Zeitraum. Nicht umgesetztes Peroxid wird in einer peroxidasekatalysierten Reaktion quantifiziert.

Nach Zugabe der Stopplösung (STOP) wird die chromogene Flüssigkeit bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen. Anhand eines mitgeführten Kalibrators lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln. Das antioxidative Potential wird in Wasserstoffperoxid-Äquivalenten angegeben.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** bringen, gut mischen.

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

Beispiel

| | mit Enzym | | ohne Enzym | | mit Enzym | | ohne Enzym | | mit Enzym | | ohne Enzym | |
|---|-----------|----|------------|----|-----------|-------|------------|-------|-----------|-----|------------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | P1 | P1 | P1 | P1 | P9 | P9 | P9 | P9 | P14 | P14 | P14 | P14 |
| B | P2 | P2 | P2 | P2 | Ctrl1 | Ctrl1 | Ctrl1 | Ctrl1 | P15 | P15 | P15 | P15 |
| C | P3 | P3 | P3 | P3 | P10 | P10 | P10 | P10 | P16 | P16 | P16 | P16 |
| D | P4 | P4 | P4 | P4 | Cal | Cal | Cal | Cal | P17 | P17 | P17 | P17 |
| E | P5 | P5 | P5 | P5 | P11 | P11 | P11 | P11 | P18 | P18 | P18 | P18 |
| F | P6 | P6 | P6 | P6 | Ctrl2 | Ctrl2 | Ctrl2 | Ctrl2 | P19 | P19 | P19 | P19 |

| | mit Enzym | | ohne Enzym | | mit Enzym | | ohne Enzym | | mit Enzym | | ohne Enzym | |
|---|-----------|----|------------|----|-----------|-----|------------|-----|-----------|-----|------------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| G | P7 | P7 | P7 | P7 | P12 | P12 | P12 | P12 | P20 | P20 | P20 | P20 |
| H | P8 | P8 | P8 | P8 | P13 | P13 | P13 | P13 | P21 | P21 | P21 | P21 |

Px = Probe, Cal = Kalibrator, Ctrl = Kontrolle

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. | 10 µl Kalibrator (rekonstituierter CAL), Kontrolle 1 oder 2 (rekonstituierte CTRL1 oder CTRL2) oder Probe in die Mikrotiterstreifen pipettieren. Bitte beachten: Proben und Kalibrator immer in vier Vertiefungen vorlegen, da eine Doppelbestimmung mit Enzym und eine ohne erfolgt. |
| 2. | 100 µl frisch angesetztes Reagenz 1 in alle Vertiefungen pipettieren. |
| 3. | 10 min bei 37 °C inkubieren. |
| 4. | 100 µl frisch angesetztes Reagenz 2a mit Enzym und Reagenz 2b ohne Enzym in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. |
| 5. | 5 min bei Raumtemperatur inkubieren. |
| 6. | 50 µl Stopplösung (STOP) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen. |
| 7. | Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm messen. |

8. ERGEBNISSE

Berechnung

Die Differenz aus der Messung mit Enzym und der ohne Enzym ist umgekehrt proportional dem Antioxidantiengehalt der Probe:

Zur Auswertung werden die OD-Werte der gemessenen Proben bzw. Kontrollen und des Kalibrators aus der Messung ohne Enzym von den OD-Werten der Messung mit Enzym subtrahiert.

An den so erhaltenen Differenzen werden dann die Proben kalibriert.

$$\text{Antioxidative Kapazität einer Probe } [\mu\text{mol/l}] = \\ 392 - (392 - \text{Kalibratorkonzentration}) \times \frac{\Delta \text{OD Probe}}{\Delta \text{OD Kalibrator}}$$

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 antioxidative Kapazitäten. Wir raten daher von der Messung solcher Proben ab.

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 auf der Spezifikation angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit EDTA-Plasmen und Seren von augenscheinlich Gesunden (n = 69) wurden folgende Referenzwerte für EDTA-Plasma und Serum ermittelt:

| | |
|----------------------------------|---------------------------|
| niedrige antioxidative Kapazität | < 280 $\mu\text{mol/l}$ |
| mittlere antioxidative Kapazität | 280-320 $\mu\text{mol/l}$ |
| hohe antioxidative Kapazität | >320 $\mu\text{mol/l}$ |
| Mittelwert | 305 $\mu\text{mol/l}$ |

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren, da Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs dient lediglich der Orientierung.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 12)

| Probe | ImAnOx® [µmol/l] | VK [%] |
|-------|------------------|--------|
| 1 | 213 | 3,99 |
| 2 | 308 | 2,04 |

Inter-Assay (n = 12)

| Probe | ImAnOx® [µmol/l] | VK [%] |
|-------|------------------|--------|
| 1 | 217 | 2,65 |
| 2 | 285 | 3,89 |

Analytische Sensitivität

Nachweisgrenze

130 µmol/l

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Kalibrator (CAL) und Kontrollen (CTRL) sind auf Humanplasma aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H₂SO₄ 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.












13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *ImAnOx*® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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.

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 | | |

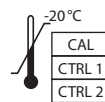
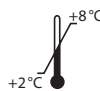
ImAnOx[®] (TAS/TAC) Kit

*Photometric test system for the determination of the
total antioxidative status/capacity (TAS/TAC)
in serum and EDTA-plasma*

Valid from 2021-06-23



KC5200



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 | 13 |
| 2. INTRODUCTION | 13 |
| 3. MATERIAL SUPPLIED | 13 |
| 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 14 |
| 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS | 14 |
| <i>Calibrators and controls</i> | 14 |
| <i>Storage of the other reagents</i> | 14 |
| <i>Preparation of reagent 1</i> | 14 |
| <i>Preparation of reagent 2</i> | 15 |
| 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES | 15 |
| 7. ASSAY PROCEDURE | 16 |
| <i>Principle of the test</i> | 16 |
| <i>Test procedure</i> | 17 |
| 8. RESULTS | 18 |
| 9. LIMITATIONS | 18 |
| 10. QUALITY CONTROL | 18 |
| <i>Reference range</i> | 18 |
| 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 19 |
| <i>Precision and reproducibility</i> | 19 |
| <i>Analytical Sensitivity</i> | 19 |
| 12. PRECAUTIONS | 19 |
| 13. TECHNICAL HINTS | 19 |
| 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE | 20 |

1. INTENDED USE

This photometric assay is intended for the quantitative determination of the total antioxidative status/capacity (TAS/TAC) in EDTA-plasma and serum. For *in vitro* diagnostic only.

2. INTRODUCTION

The human body is constantly under attack from free radicals that occur as part of normal cell metabolism, and by exposure to environmental factors such as UV light, cigarette smoke, environmental pollutants and gamma radiation. The resulting „Reactive Oxygen Species“ (ROS) circulates freely in the body with access to all organs and tissues, which can have serious repercussions throughout the body. The body possesses a number of mechanisms both to control the production of ROS and to cope with free radicals in order to limit or repair the damage to tissues

Overproductions of ROS or insufficient defense mechanisms lead to a dangerous disbalance in the organism. Thereby several pathomechanisms implicated in over 100 human diseases, e. g. cardiovascular disease, cancer, diabetes mellitus, inflammatory disease, aging, etc., were induced.

Determination of the antioxidative capacity becomes of fundamental importance in medical diagnosis and in research. The *ImAnOx*®-Assay is fast, reliable and easy to perform. The total antioxidative capacity is measured.

3. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No. | Label | Kit components | Quantity |
|-----------|----------------|---------------------------------------|-------------|
| KC5200 | PLATE | Microtiter plate | 2 pieces |
| KC5200 | CAL | Calibrator, lyophilised (250 µl) | 3 vials |
| KC5200 | CTRL1 CTRL2 | Control 1 and 2, lyophilised (250 µl) | 2 x 3 vials |
| KC5200 | PER | Peroxide solution | 250 µl |
| KC5200 | REABUF A | Reaction buffer A | 105 ml |
| KC5200 | REABUF B | Reaction buffer B | 1.5 ml |
| KC5200 | ENZ | Enzyme solution | 50 µl |
| KC5200 | STOP | Stop solution | 15 ml |
| K 0005.15 | RECSOL | Reconstitution solution | 15 ml |

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

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Vortex mixer
- Various pipettes
- Incubation chamber for 37 °C
- Microtiter plate reader

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

Calibrators 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 on the label of CAL and in the specification of the controls, respectively.

Storage of the other reagents

Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

Preparation of reagent 1

In order to ensure the functionality of reagent 1, it is important to use light-protected containers (eg brown glass) during preparation.

Reagent 1 has to be prepared directly before use. Peroxide solution (PER) is diluted in reaction buffer (REABUF).

For example:

5 ml reaction buffer A (REABUF A) + 10 µl peroxide solution (PER) = dilution 1

100 µl of dilution 1 + 4.9 ml reaction buffer A (REABUF A) = reagent 1

Please note: Reagent 1 is not stable and can not be stored.

Important: The amounts are sufficient for 50 tests (25 duplicates). For varying sample numbers, the buffer volumes must be adjusted accordingly.

Preparation of reagent 2

In order to ensure the functionality of reagent 2, it is important to use light-protected containers (eg brown glass) during preparation.

During the incubation, hydrogen peroxide generates reaction products which absorb at 450 nm. Due to this effect and self-absorption, it is important to measure **with and without addition of enzyme.**

Reagent 2 has to be prepared **directly before use.** Reaction buffer A (REABUF A) and reaction buffer B (REABUF B) are mixed with and without addition of enzyme solution (ENZ).

For example:

Reagent 2a: 5 ml reaction buffer A (REABUF A) + 100 µl reaction buffer B (REABUF B) + 5 µl enzyme solution (ENZ) = reagent 2 with enzyme solution

Reagent 2b: 5 ml reaction buffer A (REABUF A) + 100 µl reaction buffer B (REABUF B) = reagent 2 without enzyme solution

Please note: Reagent 2a with and reagent 2b without addition of enzyme solution (ENZ) is not stable and can not be stored.

Important: To avoid losses, the enzyme solution (ENZ) should be centrifuged prior to use. After use, the vial should be immediately and correctly closed to avoid contamination or evaporation (e. g. parafilm).

Important: The amounts are sufficient for 50 tests (25 duplicates). For varying sample numbers, the buffer volumes must be adjusted accordingly.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Serum and EDTA-plasma derived from venous fasting blood is suitable for this test system.

Lipaemia and haemolysis interfere with the test system. Such samples should not be measured.

Sample storage

The blood sample can be shipped at 2–8°C within 24 hours. Serum and EDTA-plasma should be stored at -20°C up to the measurement. They are stable at -20°C for 4 weeks.

Preparation

Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged (5 min at 10000 g) prior to measurement, and the resulting supernatant is used in the test.

For testing in duplicates, pipette **4 x 10 µl** of each prepared sample per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The determination of the antioxidative capacity is performed by the reaction of antioxidants in the sample with a defined amount of exogenously provided hydrogen peroxide (H_2O_2). The antioxidants in the sample eliminate a certain amount of the provided hydrogen peroxide. The residual H_2O_2 is determined photometrically by an enzymatic reaction which involves 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.

The difference between applied and measured peroxide concentration in a defined time period is proportional to the reactivity of the antioxidants of the sample (antioxidative capacity). Quantification is performed with the enclosed calibrator.

Please note: As the reaction speed of the distinct antioxidants in the sample is different, the measured concentrations of antioxidants are equivalent to the reactivity of the distinct antioxidants and not to their total amount in the sample. Therefore, we use in our test system hydrogen-peroxide equivalents as unit for the antioxidative capacity.

The concentration of total antioxidative status/capacity (TAS/TAC) can be quantified by referring the optical density of the calibrator.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** and mix well.

Mark the positions of CAL /SAMPLE/CTRL (calibrator/sample/controls) on a protocol sheet.

Example

| | with enzyme | | without enzyme | | with enzyme | | without enzyme | | with enzyme | | without enzyme | |
|---|-------------|----|----------------|----|-------------|-------|----------------|-------|-------------|-----|----------------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | P1 | P1 | P1 | P1 | P9 | P9 | P9 | P9 | P14 | P14 | P14 | P14 |
| B | P2 | P2 | P2 | P2 | Ctrl1 | Ctrl1 | Ctrl1 | Ctrl1 | P15 | P15 | P15 | P15 |
| C | P3 | P3 | P3 | P3 | P10 | P10 | P10 | P10 | P16 | P16 | P16 | P16 |
| D | P4 | P4 | P4 | P4 | Cal | Cal | Cal | Cal | P17 | P17 | P17 | P17 |
| E | P5 | P5 | P5 | P5 | P11 | P11 | P11 | P11 | P18 | P18 | P18 | P18 |
| F | P6 | P6 | P6 | P6 | Ctrl2 | Ctrl2 | Ctrl2 | Ctrl2 | P19 | P19 | P19 | P19 |
| G | P7 | P7 | P7 | P7 | P12 | P12 | P12 | P12 | P20 | P20 | P20 | P20 |
| H | P8 | P8 | P8 | P8 | P13 | P13 | P13 | P13 | P21 | P21 | P21 | P21 |

Px = patient sample, Cal = calibrator, Ctrl = control

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. | Add 10 µl of calibrator (reconstituted CAL), sample or control 1 or 2 (reconstituted CTRL1 or CTRL2) into the respective wells. Please note: Always pipet samples, controls and calibrator in 4 wells, 2 wells for enzyme treatment and 2 without enzyme treatment. |
| 2. | Add 100 µl freshly prepared reagent 1 in each well. |
| 3. | Incubate for 10 min at 37 °C |
| 4. | Add 100 µl freshly prepared reagent 2a (with enzyme), respectively reagent 2b (without enzyme) in the appropriate wells. |
| 5. | Incubate for 5 min at room temperature . |
| 6. | Add 50 µl stop solution (STOP) and mix well. |
| 7. | Determine absorption immediately with an microtiter plate reader at 450 nm . |

8. RESULTS

Calculation

The difference of the sample values with and without enzyme is inversely proportional to the antioxidative capacity:

To get the ΔOD , subtract the OD-values of samples without enzyme from the OD values of samples with enzyme. The antioxidative capacity is calculated according to the following formula:

$$\text{antioxidative capacity of a sample } [\mu\text{mol/l}] = 392 - (392 - \text{calibrator concentration}) \times \frac{\Delta OD \text{ sample}}{\Delta OD \text{ calibrator}}$$

9. LIMITATIONS

The use of heparin plasma results in clouding of the starting solution and thus to incorrect measurement results. Strong haemolytic and lipaemic samples often show pathological antioxidant capacity. We therefore do not recommend the measurement of such samples. Whole blood is not suitable for the measurement.

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

Based on Immundiagnostik studies of EDTA-plasma and serum of apparently healthy persons (n = 69), the following reference values have been estimated:

| | |
|-------------------------------|---------------------------|
| low antioxidative capacity | < 280 $\mu\text{mol/l}$ |
| middle antioxidative capacity | 280-320 $\mu\text{mol/l}$ |
| high antioxidative capacity | > 320 $\mu\text{mol/l}$ |
| Mean value | 305 $\mu\text{mol/l}$ |

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 12)

| Sample | ImAnOx® [µmol/l] | CV [%] |
|--------|------------------|--------|
| 1 | 213 | 3,99 |
| 2 | 308 | 2,04 |

Inter-Assay (n = 12)

| Sample | ImAnOx® [µmol/l] | CV [%] |
|--------|------------------|--------|
| 1 | 217 | 2,65 |
| 2 | 285 | 3,89 |

Analytical Sensitivity

Limit of detection

130 µmol/l

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS












- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.

- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *ImAnOx*® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- 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.

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 | | |