

# ImAnOx

*Photometrisches Testsystem zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität aus Serum und EDTA-Plasma*

•  
*Colorimetric test system for the determination of antioxidative capacity in serum and EDTA-plasma*

Gültig ab/valid from 22.01.2002

Artikelnummer/Catalogue no.:	KC 5200
Packungsgröße/Package size:	96 Tests/96 determinations
Lagerung/Storage:	2-8 °C, Kalibrator bei -20 °C 2-8 °C, calibrator at -20 °C

CE

---

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>3</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN</b>	<b>5</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>6</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
HINWEISE	6
ARBEITSSCHEMA	7
PIPETTIERSCHEMA (BEISPIEL)	7
<b>10. AUSWERTUNG</b>	<b>8</b>
<b>11. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>8</b>
<b>12. ASSAY-CHARAKTERISTIKA</b>	<b>8</b>
NORMBEREICH	8
KONTROLLEN	9
<b>13. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>9</b>
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	9
NACHWEISGRENZE	9
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>10</b>

---

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>12</b>
<b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST</b>	<b>12</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>12</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>13</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>13</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>14</b>
RECONSTITUTION OF REACTION BUFFER B	14
PREPARATION OF REAGENT 1	14
PREPARATION OF REAGENT 2A AND 2B	14
RECONSTITUTION OF CALIBRATORS AND CONTROLS	14
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>15</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>15</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>16</b>
PROCEDURAL NOTES	16
SAMPLE AND STANDARD PREPARATION	16
PIPETTING SCHEME	17
<b>10. RESULTS</b>	<b>17</b>
CALCULATION	17
<b>11. LIMITATIONS</b>	<b>18</b>
<b>12. QUALITY CONTROL</b>	<b>18</b>
EXPECTED VALUES	18
CONTROLS	18
<b>13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>19</b>
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	19
DETECTION LIMIT	19
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>20</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser photometrische Test ist für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität 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 kardiovasikulären Erkrankungen und die Arteriosklerose. Aber auch die Beteiligung an Entzündungsvorgängen, Sepsis, Karzinogenese und neurodegenerativen Prozessen ist augenscheinlich und causativ.

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 aufwendig (HPLC) oder weisen nur Abbauprodukte mehrfach ungesättigter Fettsäuren nach (z. B. TBARS).

Der **Antioxidative Kapazitäts**-Assay hingegen ist schnell und einfach abzuarbeiten und erfaßt die **gesamte antioxidative Kapazität** einer Probe.

## 3. TESTPRINZIP

Die Bestimmung der Antioxidantien erfolgt über eine Reaktion von exogenem Peroxid mit den in der Probe vorliegenden Antioxidantien über einen bestimmten Zeitraum. Nicht umgesetztes Peroxid wird in einer peroxidasekatalysierten Reaktion quantifiziert.

Nach Zugabe der Stoplösung wird die chromogene Flüssigkeit bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen. Die Quantifizierung erfolgt über einen mitgelieferten Kalibrator. Das antioxidative Potential wird in Wasserstoffperoxid-Äquivalenten angegeben.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
KC5200ka	Kalibrator (lyoph. 250 µl)	3 Fläschchen
KC5200ko	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 250 µl)	je 1 Fläschchen
KC5200mp	Mikrotiterplatte	2 Stück
KC5200pl	Peroxidlösung	0,25 ml
KC5200ra	Reaktionspuffer A	105 ml
KC5200rb	Reaktionspuffer B (lyoph.0,6 ml)	2 Fläschchen
KC5200lc	Lösung C	1,5 ml
KC5200el	Enzymlösung	35 µl
KC5200sl	Stopplösung( <b>Vorsicht: ätzend</b> )	11 ml
KC5200rl	Rekonstitutionslösung	5 ml

#### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex-Wirbelmischer
- diverse Pipetten
- ELISA-Reader
- Temperiereinheit für 37 °C

#### 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Die Testreagenzien sind bei 4 °C, die Standardlösungen bei –20 °C bis zum Verfalldatum (siehe Etikett) verwendbar.

##### Rekonstitution Reaktionspuffer B

- Der Reaktionspuffer B wird in **600 µl** Lösung C resuspendiert.

Zum vollständigen Lösen des Lyophilisats wird 2 min auf einem Vortex-Wirbelmischer geschüttelt. Die Reaktionsmischung ist lichtempfindlich und sollte im Dunkeln gelagert werden. Sie ist bei 2-8 °C 3 Monate stabil.

### Herstellung der Reagenzien

- Das **Reagenz 1** wird wie folgt unmittelbar vor Testansatz hergestellt:  
5 ml Reaktionspuffer A + 10 µl Peroxidlösung = Vorverdünnung  
100 µl Vorverdünnung + 4,9 ml Reaktionspuffer A = **Reagenz 1**  
**Reagenz 1** kann **nicht** aufbewahrt werden.
- Das **Reagenz 2** wird wie folgt unmittelbar vor Testansatz hergestellt:  
Aufgrund der Eigenabsorption der Probe und der während der Inkubation durch Wasserstoffperoxid gebildeten, bei 450 nm absorbierenden, Reaktionsprodukte ist es nötig, die Messung mit und ohne Zugabe von Enzym durchzuführen.
  - a) 5 ml Reaktionspuffer A + 100 µl Reaktionspuffer B + 5 µl Enzymlösung
  - b) 5 ml Reaktionspuffer A + 100 µl Reaktionspuffer B

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

**Wichtig:** Die Enzymlösung muß nach Gebrauch wieder mit Dichtfilm (z.B. Parafilm) verschlossen werden.

### Rekonstitution von Kalibrator und Kontrollen

- Ein **Kalibratorfläschchen** und die **Kontrollen** werden mit 250 µl Rekonstitutionslösung resuspendiert.  
Nach ca. 5 min werden der **Kalibrator** und die **Kontrollen** mittels Vortex-Wirbelmischer homogenisiert und anschließend aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die so behandelten Proben sind 2 Wochen bei -20°C stabil.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen 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.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnte  $H_2SO_4$ .  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muß auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muß die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

- Als Probe eignet sich Serum und EDTA-Plasma aus venösem Nüchternblut. 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. Sie sind über einen Zeitraum von 1 Woche stabil.
- 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 Assay zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10.000 g) und der resultierende Überstand im Test eingesetzt werden.

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumen sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der, im Kit beigefügten, Arbeitsanleitung abzarbeiten.

## Arbeitsschema

Die Mikrotiterplatte ist gebrauchsfertig.

1. **10 µl** Probe bzw. Kalibrator/Kontrolle in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Bitte beachten Sie: Proben und Kalibrator immer in vier Vertiefungen vorlegen, da eine Doppel-Messung mit Enzym und eine ohne erfolgt.
2. **100 µl** Reagenz 1 hinzugeben.
3. **10 min** bei 37 °C inkubieren.
4. **100 µl** Reagenz 2 a (mit Enzym) bzw. b (ohne Enzym) hinzugeben.
5. **5 min** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. **50 µl** Stopplösung hinzugeben.
7. Messung: erfolgt sofort nach Zugabe der Stopplösung bei 450 nm im ELISA Reader.

## Pipettierschema (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
<b>A</b>	P1	P1	P1	P1	P9	P9	P9	P9	P14	P14	P14	P14
<b>B</b>	P2	P2	P2	P2	K1	K1	K1	K1	P15	P15	P15	P15
<b>C</b>	P3	P3	P3	P3	P10	P10	P10	P10	P16	P16	P16	P16
<b>D</b>	P4	P4	P4	P4	Kal	Kal	Kal	Kal	P17	P17	P17	P17
<b>E</b>	P5	P5	P5	P5	P11	P11	P11	P11	P18	P18	P18	P18
<b>F</b>	P6	P6	P6	P6	K2	K2	K2	K2	P19	P19	P19	P19
<b>G</b>	P7	P7	P7	P7	P12	P12	P12	P12	P20	P20	P20	P20
<b>H</b>	P8	P8	P8	P8	P13	P13	P13	P13	P21	P21	P21	P21

Kal: Kalibrator                      K1: Kontrolle 1

K2: Kontrolle 2                      Px: Patientenprobe



## 10. AUSWERTUNG

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

Zur Auswertung werden von den gemessenen Proben/Kontrollen und dem Kalibrator die erhaltenen OD-Werte der Messung „ohne Enzym“ von den OD-Werten der Messung „mit Enzym“ subtrahiert.

An den so erhaltenen Differenzen werden dann die Proben kalibriert.

$$\text{Antioxidative Kapazität einer Probe } (\mu\text{mol/l}) = 392 - (392 - \text{Konz. Kalibrator}) * \frac{\Delta\text{OD Probe}}{\Delta\text{OD Kalibrator}}$$

## 11. 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.

## 12. ASSAY-CHARAKTERISTIKA

Normbereich

(vorläufig)

**EDTA-Plasma und Serum:**

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

Der Mittelwert eines augenscheinlich gesunden Kontrollkollektivs wurde bei 305  $\mu\text{mol/l}$  gefunden (n=69).

Wir empfehlen, daß jedes Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich erstellt, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung.

## Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Lauf Kontrollen mitgeführt werden. Wenn eine oder mehrere Kontrollen eines Laufs ausserhalb ihres Bereichs liegen ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

## 13. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

<b>Intra-Assay VK:</b>	0,93 % (181 µmol/l)	[n = 12]
	2,33 % (217 µmol/l)	[n = 12]
<b>Inter-Assay VK:</b>	1,63 % (185 µmol/l)	[n = 12]
	2,43 % (217 µmol/l)	[n = 12]

### Nachweisgrenze

130 µmol/l

## **14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST**

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur in-vitro-Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Arbeitsanleitung/Manual

# ImAnOx

*Photometrisches Testsystem zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität aus Serum und EDTA-Plasma*

•

*Colorimetric test system for the determination of antioxidative capacity in serum and EDTA-plasma*

Gültig ab/valid from 25.11.2001

Artikelnummer/Catalogue no.:

KC 5200

Packungsgröße/Package size:

96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage:

2-8 °C, Kalibrator bei -20 °C

2-8 °C, calibrator at -20 °C

CE

## 1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of antioxidants in EDTA-plasma and serum. This Assay is designed for in vitro diagnostic use only.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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) circulate 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

Overproduction of ROS or insufficient defence 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. 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 colorimetrically 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.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

<i>Catalog No</i>	<b>Kit Components</b>	<b>Quantity</b>
KC5200ka	Calibrator (lyoph. 250 µl)	3 vials
KC5200ko	Control 1 and 2 (lyoph. 250 µl)	1 vial each
KC5200mp	Microtitre plate	2 pieces
KC5200pl	Peroxide solution	0.25 ml
KC5200ra	Reaction buffer A	105 ml
KC5200rb	Reaction buffer B (lyophilised)	2 vials
KC5200lc	Solution C	1.5 ml
KC5200el	Enzyme solution	35 µl
KC5200sl	ELISA stop solution, ready to use	11 ml
KC5200rl	Reconstitution solution (aqua bidest.)	5 ml

#### 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Vortex mixer
- Precision pipettors calibrated to deliver 10-100 µl
- ELISA-reader
- Incubation chamber for 37 °C

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

### Reconstitution of reaction buffer B

- Resuspend the reaction buffer B with **600 µl** solution C and mix for 2 minutes on a vortex-mixer. The reaction buffer B is light sensitive and should be stored in the dark. It is stable for 3 month at 2-8 °C.

This is just an example. The volumes are sufficient for 50 determinations. For larger or less approaches, the amounts of buffer have to be adjusted to the desired volumes.

### Preparation of reagent 1

- **Reagent 1 has to be prepared directly before use:**

Add **5 ml** reaction buffer A and **10 µl** peroxide solution = **dilution 1**

Add **100 µl** of dilution 1 and **4.9 ml** of reaction buffer A = **reagent 1**

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

### Preparation of reagent 2a and 2b

- **Reagent 2a and 2b have to be prepared directly before use:**

Because of the self-absorption of the sample and the reaction products produced by the added hydrogen peroxide which are both detectable at 450 nm, it is of great importance to measure the sample **with** and **without** addition of enzyme.

- **Reagent 2a:**

Add **5 ml** reaction buffer A + **100 µl** reaction buffer B + **5 µl** enzyme solution **Important:** The enzyme solution must be sealed with parafilm after use.

- **Reagent 2b:**

Add **5 ml** reaction buffer A + **100 µl** reaction buffer B

### Reconstitution of calibrators and controls

The calibrators and controls have to be reconstituted in **250 µl** reconstitution solution (aqua bidest.).

After 5 minutes they should be homogenized on a vortex mixer. Take aliquots and store them at -20°C (the reconstituted calibrator and controls are stable for at least 2 weeks at -20°C). Avoid repeated freeze-thaw cycles. The concentration might have minor changes from lot to lot.

\*Additional controls can be ordered separately. Catalog No.: KC5200ko

## 7. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- This product contains human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2, and anti-HCV. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HVC or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- The stop solution contains acid. It 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 out immediately with copious quantities of water. Do not breath vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### EDTA-plasma and serum

- Venous fasting blood is suitable for this test system. The blood sample can be shipped at 2-8 °C in at least 24 hours. Serum and EDTA-plasma should be stored at -20 °C up to the measurement. They are stable at -20 °C for 1 week.
- 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 10000 g) prior to measurement, and the resulting supernatant is used in the test.



## 9. ASSAY PROCEDURE

### Procedural notes

- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- The assay should always be performed due to the manual which is given in the kit.

### Sample and standard preparation

The microtitre plate is ready to use.

**10 µl** sample, calibrator and control are pipetted in duplicates in appropriate wells.

**100 µl** reagent 1 is added.

Incubate for **10 min** at **37°C**.

**100 µl** reagent 2a respectively reagent 2b is added.

Incubate for **5 min** at **room temperature**.

Add **50 µl** stop solution.

**Measurement:** is performed immediately after addition of the stop solution at 450 nm in the ELISA reader.

## Pipetting scheme

(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	C1	C1	C1	C1	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	C2	C2	C2	C2	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

Cal: Calibrator

C1: Control 1

C2: Control 2

Px: Patient sample

**10. RESULTS**

## Calculation

The difference of the measurement of the sample „with enzyme“ and „without enzyme“ is inverse proportional to the antioxidative capacity:

For evaluation subtract the OD-values of the measurement „without enzyme“ from the OD-values of the measurement „with enzyme“ to get the  $\Delta$ OD. The antioxidative capacity can be calculated with the following formula.

$$\text{Antiox. capacity of the sample } (\mu\text{mol/l}) = 392 - (392 - \text{Conc. Calibrator}) * \frac{\Delta\text{OD sample}}{\Delta\text{OD Calibrator}}$$

## 11. LIMITATIONS

Whole blood or heparin-plasma can not be used.

Strong haemolytic and lipaemic samples often show pathological concentrations. We recommend not to measure those samples.

## 12. QUALITY CONTROL

Expected values

Normal values (preliminary):

EDTA-plasma and serum:

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

The mean value of an apparently healthy group of people were found at 305  $\mu\text{mol/l}$  (n=69).

We recommend, that each laboratory should establish its own normal range. The values mentioned above are preliminary data and can deviate from other results published.

### Controls

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

### 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### Precision and reproducibility

**Intra-Assay CV:** 0.9 % (181  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

2.3 % (217  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

**Inter-Assay CV:** 1.63 % (185  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

2.43 % (217  $\mu\text{mol/l}$ ) [n = 12]

#### Detection limit

130  $\mu\text{mol/l}$

## 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for research only.
- The reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure that are not coordinated with the producer may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can, therefore, not be held reliable for any damage resulting from this.

**Short Protocol for the determination of antioxidative capacity in serum/EDTA-plasma (see page 6 for more details)**

Allow reagents to reach room temperature.  
Prepare ELISA reagents 1 and 2a/b (see page 4)

Pipette **10 µl** calibrators, samples and controls into each well

Add **100 µl** of reagent 1

Incubate for **10 min** at 37°C

Add **100 µl** reagent 2a, respectively reagent 2b

Incubate for **5 min** at room temperature

Add **50 µl** stop solution into each well

**Immediately measure the extinction at 450**