



Arbeitsanleitung/Manual

PerOx (TOS) Kit

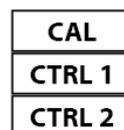
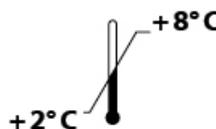
Photometrisches Testsystem zur Bestimmung des gesamten oxidativen Status(TOS) EDTA-Plasma, Serum und anderen biologischen Proben

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

Gültig ab / Valid from 02.08.2006



KC 5100



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 701900
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Immundiagnostik@t-online.de
www.Immundiagnostik.com

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

1. INTENDED USE	13
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	13
3. PRINCIPLE OF THE TEST	13
4. MATERIAL SUPPLIED	14
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	14
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	15
7. PRECAUTIONS	15
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	16
9. ASSAY PROCEDURE	17
SAMPLE PREPARATION	17
10. RESULTS	18
CALCULATION	18
11. LIMITATIONS	18
12. QUALITY CONTROL	19
EXPECTED VALUES	19
CONTROLS	19
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	19
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	20
LINEARITY	20
DETECTION LIMIT	20
14 REFERENCES	20
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	21

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser photometrische Test ist für die Bestimmung des **gesamten oxidativen Status (TOS, total oxidative status)** 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 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 **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. 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.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
KC5100KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 0,25 ml; Konzentration siehe Etikett)	3 Fläschchen
KC5100KO	CTRL1 CTRL2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 0,25 ml)	je 3 Fläschchen
KC5100RA	REABUF A	Reaktionspuffer A	25 ml
KC5100RB	REABUF B	Reaktionspuffer B	1 ml
KC5100EL	ENZ	Enzymlösung	50 µl
KC5100RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	5 ml
KC5100SL	STOP	Stopplösung	6 ml
KC5100MTP	PLATE	Mikrotiterplatte	1 Stück

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

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 2-8 °C, der **Kalibrator** (CAL) und die **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) bei -20 °C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

Herstellung der Reagenzien

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

5 ml Reaktionspuffer A (REABUF A) + **100 µl** Reaktionspuffer B (REABUF B) + **5 µl** Enzymlösung (ENZ)

Der Reaktionspuffer B (REABUF B) ist lichtgeschützt aufzubewahren.

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 (REABUF A; REABUF B) und die Enzymlösung (ENZ) sind bei 2-8°C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.

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.

Rekonstitution von Kalibrator und Kontrollen

- Der **Kalibrator** (CAL) und die **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) werden in **250 µl** Rekonstitutionslösung (RECSOL) resuspendiert.

Nach ca. 5 min werden der **Kalibrator** (CAL) und die **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) mittels Vortex-Wirbelmischer homogenisiert, anschließend aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die so behandelten **Kalibrator** (CAL) und **Kontrollen** (CTRL1, CTRL2) sind 4 Wochen bei -20°C stabil.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- 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.
- Die Stopplösung (STOP) besteht aus verdünnte H₂SO₄. H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H₂SO₄ 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

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. Bei der Probengewinnung ist zu beachten, dass bei Serum die Gerinnungszeit von 30 min bei Zimmertemperatur nicht überschritten wird. Anschließend müssen die Seren bei -20 °C bis zur Messung gelagert werden. EDTA-Plasma ist bei -20 °C mindestens über einen Zeitraum von 4 Wochen stabil.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden. Heparinplasma ist nicht geeignet.
- Proben, welche sichtbare Mengen an Feststoff (meist Kryoproteine) enthalten, sollten vor Einsatz im PerOx zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10000 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 μl eines 30% H_2O_2 Konzentrats mit **1000 μl** Reaktionspuffer A (REABUF A) verdünnen = S_0

5 μl der Lösung S_0 mit **1000 μl** Reaktionspuffer A (REABUF A) verdünnen = S_1

Ansatz 1: **10 μl** Zellkulturmedium in Kavität pipettieren

Ansatz 2: **10 μl** bidest. H_2O in andere Kavität pipettieren

Jeweils **10 μl** S_1 zu beiden Ansätzen geben, anschließend **100 μl** Reaktionspuffer A (REABUF A) und **100 μl** Reaktionspuffermischung (Herstellung siehe vorne) pipettieren. Nach **5 min** Stopplösung (STOP) zugeben und sofort bei 450 nm im ELISA Reader messen.

Beurteilung der Zellkulturmedium-Resultate

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

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina 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.

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

1. **10 µl** Probe, Kalibrator (CAL), Kontrollen (CTRL1, CTRL2) und Leerwert/Rekonstitutionslösung (RECSOL) in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. **100 µl** Reaktionspuffer A (REABUF A) hinzugeben.
3. **Messung 1:** Messung der Eigenabsorption der Proben im ELISA Reader bei 450 nm.
4. **100 µl** Reaktionspuffermischung hinzugeben.
5. **15 min** bei **37° C** inkubieren.
6. **50 µl** Stopplösung (STOP) hinzugeben.
7. **Messung 2:** erfolgt sofort nach Zugabe der Stopplösung (STOP) bei 450 nm im ELISA Reader.

10. AUSWERTUNG

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

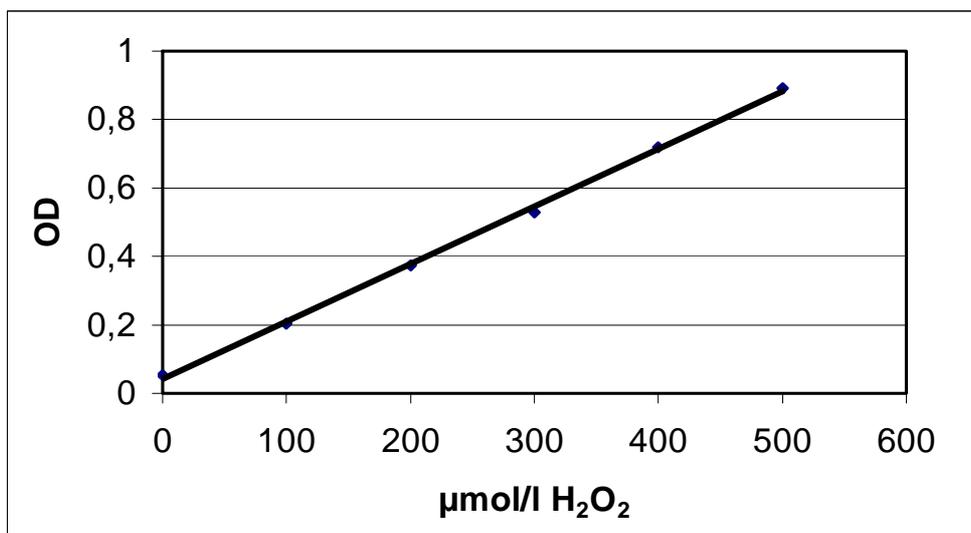
Zur Auswertung werden von den gemessenen Proben, Kalibrator (CAL) und Kontrollen (CTRL1, CTRL2) die erhaltenen OD-Werte der 1. Messung von den OD-Werten der 2. Messung subtrahiert.

Proben und Kontrollen (CTRL1, CTRL2) werden dann am Kalibrator (CAL) kalibriert (Konzentration, siehe Etikett). Die Konzentration des Kalibrators (CAL) ist in H₂O₂-Äquivalenten (µmol/l) angegeben und entspricht der OD-Differenz, welche eine wässrige H₂O₂-Lösung derselben Konzentration nach Aufarbeitung im PerOx-Test zeigt.

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

Hinweis: Die unten dargestellte Mustereichgerade dient lediglich der Anschauung. Da die Reaktion in dem gewählten Konzentrationsbereich linear verläuft, kann eine Einpunktkalibrierung mittels des beigefügten Kalibrators als ausreichend erachtet werden.

Mustereichgerade



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 Peroxid-Konzentrationen. Wir raten daher von der Messung solcher Proben ab. Vollblut ist nicht für die Messung geeignet.

12. ASSAY-CHARAKTERISTIKA

Normbereich

EDTA-Plasma:	< 200 µmol/l	gut
	200 bis 350 µmol/l	mäßige oxidative Belastung
	> 350 µmol/l	starke oxidative Belastung
Serum:	< 180 µmol/l	gut
	180 bis 310 µmol/l	mäßige oxidative Belastung
	> 310 µmol/l	starke oxidative Belastung

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 und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

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

Intra-Assay VK: 3,1 % (221 µmol/l) [n = 12]

Inter-Assay VK: 5,1 % (221 µmol/l) [n = 12]

Nachweisgrenze

7 µmol/l

Linearität

bis 800 µmol/l

14 LITERATUR

Schimke I, et al. J Am Coll Cardiol 2001;38:178-83.

Hildebrandt W, et al. Blood 2002;99:1552-5

Reichenbach et al. Antioxid redox signal 2002; 4: 465-69

15. 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 Pipettiervolumina 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.

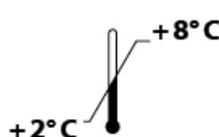
PerOx (TOS) Kit

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

Valid from 02.08.2006



KC 5100



CAL
CTRL 1
CTRL 2



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 701900
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Immundiagnostik@t-online.de
www.immundiagnostik.com

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of the **total oxidative status (TOS)** in EDTA-plasma, serum and cell culture supernatants. This Assay is designed for *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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. 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.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No		Kit Components	Quantity
KC5100KA	CAL	Calibrator (lyoph. 0,25 ml)	3 vials
KC5100KO	CTRL1 CTRL2	Control 1 and 2 (lyoph. 0,25 ml)	3 vials each
KC5100RA	REABUF A	Reaction buffer A	25 ml
KC5100RB	REABUF B	Reaction buffer B	1 ml
KC5100EL	ENZ	Enzyme solution	50 µl
KC5100RE	RECSOL	Reconstitution solution	5 ml
KC5100SL	STOP	Stop solution	6 ml
KC5100MTP	PLATE	Microtiter plate	1 plate

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

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

All reagents are stable at 2-8 °C; **calibrator** (CAL) and **controls** (CTRL1, CTRL2) at -20 °C up to the expiry date stated on of the label.

Preparation of the reaction buffer mixture

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

5 ml reaction buffer A (REABUF A) + 100 µl reaction buffer B (REABUF B) + 5 µl enzyme solution (ENZ)

The reaction buffer B should be stored in the dark.

Important: The amounts are sufficient for 40 tests (20 duplicates). For varying sample numbers, the buffer volumes must be adjusted accordingly.

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).

Reconstitution of calibrator and controls

The **calibrator** (CAL) and **controls** (CTRL1, CTRL2) must be reconstituted in 250 µl reconstitution solution (RECSOL).

After 5 minutes, homogenize reconstituted calibrators (CAL) and controls (CTRL1, CTRL2) on a vortex mixer. Take aliquots and store them at -20°C. Reconstituted calibrators (CAL) and controls (CTRL1, CTRL2) are stable for at least 4 weeks at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw circles. The concentration might have minor changes from lot to lot.

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 (STOP) 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 breathe 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 suited for this test system. EDTA-plasma should be preferred because in serum a time dependent increase in peroxide concentration is observed. During preparation of serum it is important not to exceed 30 min at room temperature for clotting. Serum should be stored at -20 °C up to the measurement. EDTA-plasma is stable at -20 °C for 4 weeks. To avoid precipitation, heparinized plasma must not be used.
- 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.

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% conc. H₂O₂ with **1000 µl** of reaction buffer A (REABUF A) = **S₀**.

Dilute **5 µl** of **S₀** with **1000 µl** of reaction buffer A (REABUF A) = **S₁**

Step 1: Pipette 10 µl of the cell culture medium in duplicates in the wells.

Step 2: Pipette 10 µl of aqua bidest. in duplicates in other wells.

- Add **10 µl S₁**
- Add **100 µl** of reaction buffer A (REABUF A) and **100 µl** of reaction buffer mixture (see above)
- Incubate for **5 min**
- Add **50 µl** of stop solution (STOP) and measure immediately at 450 nm in the ELISA reader.

Evaluation of the cell culture results

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

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 according the enclosed manual.

Sample preparation

The microtiter plate is ready to use.

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

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

10. RESULTS

Calculation

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

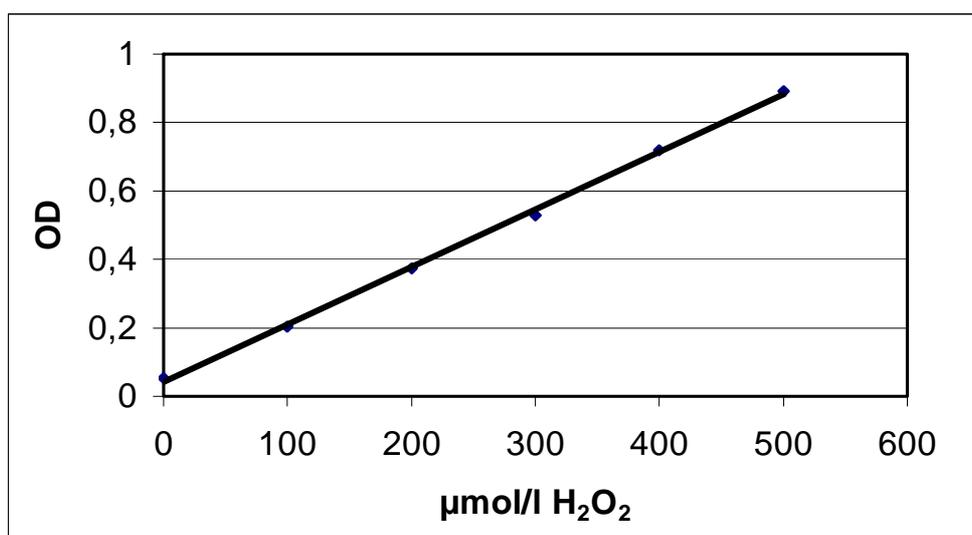
For evaluation of the measured samples, calibrator and controls, the optical densities of measurement 1 are subtracted from the optical densities of measurement 2.

Samples and controls are then calibrated by the use of the calibrator (concentration is given on the label). The concentration of the calibrator is given in H₂O₂-equivalents (μmol/l) and corresponds to the difference-OD of an aqueous H₂O₂-solution with the same concentration measured in the PerOx assay.

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

Note: This linear standard curve is only for demonstration purposes. A standard curve should be generated for each set of samples assayed. Because of the linearity, only one-point calibration using the purchased calibrator is sufficient.

Standard curve



11. LIMITATIONS

Whole blood or heparin-plasma can not be used.

Strong haemolytic and lipaemic samples often show pathological concentrations. We don't recommend analysis of such samples.

12. QUALITY CONTROL

Expected values

EDTA-plasma:	< 200 $\mu\text{mol/l}$	low oxidative stress
	200 to 350 $\mu\text{mol/l}$	moderate oxidative stress
	> 350 $\mu\text{mol/l}$	high oxidative stress
Serum:	< 180 $\mu\text{mol/l}$	low oxidative stress
	180 to 310 $\mu\text{mol/l}$	moderate oxidative stress
	> 310 $\mu\text{mol/l}$	high oxidative stress

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

Controls

Control samples should be analyzed 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.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV: 3.1 % (221 $\mu\text{mol/l}$) [n = 12]

Inter-Assay CV: 5.1 % (221 $\mu\text{mol/l}$) [n = 12]

Linearity

up to 800 $\mu\text{mol/l}$

Detection limit

7 $\mu\text{mol/l}$

14 REFERENCES

Schimke I, et al. J Am Coll Cardiol 2001;38:178-83.

Hildebrandt W, et al. Blood 2002;99:1552-5

Reichenbach et al. Antioxid redox signal 2002; 4: 465-69

15. 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.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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 wrong use.