

OXYSTAT

COLORIMETRIC ASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF PEROXIDES
IN EDTA PLASMA, SERUM AND OTHER BIOLOGICAL FLUIDS
CAT. NO. BI-5007 12 x 8 TESTS

KOLORIMETRISCHER TEST ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON PEROXIDE IN
EDTA PLASMA, SERUM UND ANDEREN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN
KAT. NR. BI-5007 12 x 8 TESTE

ESSAI COLORIMETRIQUE POUR LA DETERMINATION QUANTITATIVE DE
PEROXYDES DANS LE PLASMA EDTA, LE SERUM OU D'AUTRES FLUIDES
BIOLOGIQUES
RÉF : BI-5007 12 X 8 TESTS

ENZIMOINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE PEROXIDES
EN PLASMA EDTA, SUERO Y OTROS FLUIDOS BIOLOGICOS
CAT. NO. BI-5007. 12 X 8 TESTS

rev.no. 070515 (replacing 061230)

Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 85, E-mail export@bmgrp.at



BIOMEDICA
BIOMEDICA
GRUPPE 
www.bmgrp.com

CONTENT / INHALT / SOMMAIRE / CONTENIDO

- 1) ENGLISH..... 3**
- 2) DEUTSCH ... 7**
- 3) FRANCAIS...11**
- 4) ESPANIOL... 15**

Additional Information about our products is available on our homepage

Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich

Des informations complémentaires sur notre gamme de produits sont disponibles sur notre site Internet

Encontrará información adicional sobre nuestros productos en nuestra página web

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

Cells and tissues are sensitive to oxidative stress, caused by the formation of free radicals. If not deactivated by antioxidants, organic peroxides and hydroperoxides are the first reaction products between cellular constituents and free radicals or other reactive oxygen derivatives.

The determination of the oxidative status / oxidative stress is essential in today's medical research and diagnostics. Methods used so far were either expensive (HPLC), or detected only degradation products of polyunsaturated fatty acids, like TBARS (thiobarbituric acid reactive substances).

The Biomedica OxyStat assay measures the total peroxide concentration of a sample, utilizing a quick and simple assay procedure. Results show a direct correlation between free radicals and circulating biological peroxides and thus allow the characterization of the oxidative status in biological samples.

Possible Indications

- Cardiovascular disease
- Artherosclerosis
- Sepsis
- Carcinogenesis
- Inflammatory processes
- Neurogenerative processes

2) CONTENTS OF THE KIT

| CONT | KIT COMPONENTS | QUANTITY |
|-----------|---|------------------------|
| PLATE | Microtiter strips in strip holder | 12 x 8 tests |
| SOLA | Solution A, Sample buffer, ready to use | 1 x 25 ml |
| SOLB | Solution B, Reaction buffer, ready to use | 1 x 1ml |
| SOLC | Solution C, Enzyme solution, ready to use | 1 x 50µl |
| SOLD | Solution D, Reconstitution solution, ready to use | 1 x 5 ml |
| CTRL 1+ 2 | Controls, lyophilised. The concentration after reconstitution is stated on the label | 2x 1 vial lyophilised |
| CAL | Calibrators, lyophilised. The concentration after reconstitution is stated on the label | 3 x 1 vial lyophilised |
| STOP | STOP solution, sulphuric acid, ready to use | 1 x 6 ml |

3) ADDITIONAL MATERIAL ADDED TO THE KIT

- Instruction manual for use
- Protocol sheet

4) EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 5 µl – 5000 µl and disposable tips
- Elisa reader for absorbance at 450 nm
- Incubator for 37°C

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

We recommend EDTA-plasma as sample type because in serum a time dependent increase in peroxide concentration is observed. When serum is chosen, please make sure that during preparation of serum a no longer time period than 30 min at room temperature is allowed for clotting. Store EDTA or serum samples at -20°C . Heparinized plasma should not be used for this assay, because it often precipitates upon storage and thus changes the results.

Heparin-plasma, lipemic or haemolytic samples may give erroneous results.

Cloudy samples should be centrifuged at least 5 minutes at 5000xg before used in the assay. All samples should be mixed well before assaying.

Reconstitute as follows:

- Dissolve one CAL (calibrator) and each CTRL (control) in 250 μl solution D and leave at room temperature ($18-26^{\circ}\text{C}$) for five minutes, mix well. Reconstituted CAL and CTRL can be stored aliquoted and frozen at -20°C up to one month.
- The following volume of ABC-reaction-mix is sufficient for 40 tests (wells) and should be used as guidance. However, the volume should be adjusted to the respective number of samples.
- Prepare the ABC-reaction-mix immediately before the assay by mixing:
5 ml solution A + 100 μl solution B + 5 μl solution C

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

The peroxide concentration is determined by reaction of the biological peroxides with peroxidase and a subsequent color-reaction using TMB as substrate. After addition of a stop solution, the coloured liquid is measured photometrically at 450 nm.

A calibrator is used to calculate the concentration of circulating biological peroxides in the sample (one-point calibration)

7) ASSAY PROTOCOL

| |
|---|
| All reagents and samples must be at room temperature ($18-26^{\circ}\text{C}$) before use in the assay |
| Mark position for CTRL/CAL/SAMPLE (Control/Calibrator/Sample) on the protocol sheet |
| Take microtiterstrips out of the plastic bag and mark as appropriate. Store unused strips in the bag.. |
| Add 10 μl CTRL/CAL/SAMPLE (Control/Calibrator/Sample) into respective well |
| Add 100 μl SOLA (Solution A Sample buffer) into each well |
| Measurement 1: Determine adsorption with an Elisa reader at 450 nm |
| Add 100 μl of the freshly prepared ABC-reaction-mix into all wells (see section 5) Reagents and Sample preparation). |
| Incubate 15 minutes at 37°C |
| Add 50 μl STOP (Stop solution) into each well |
| Measurement 2: Determine absorption with an ELISA reader at 450 nm |

Assay procedure for automated pipetting systems

- Adjust volumes of the reaction solutions and samples according to the analyser used.
- If the analyzer is incapable of adding the stop-solution, perform kinetic measurements at 405 nm or at 580 - 620 nm without stopping the reaction.
- Measurement time: 15 minutes at $20 - 37^{\circ}\text{C}$.

8) CALCULATION OF RESULTS

The differences between measurement 1 and 2 are proportional to the peroxide concentrations of the samples.

- For each CTRL/CAL/SAMPLE (Control/Calibrator/Sample) subtract the OD-values of measurement 1 from the OD-values of measurement 2 (= OD)
- A single-point calibration is done using the CAL (Calibrator). The OD-value is proportional to its concentration, which is stated on the label. This concentration is stated as H₂O₂-equivalents (μmol/l).
- The concentrations of controls and samples are calculated according to the following formula:

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

9) ASSAY CHARACTERISTICS

| | |
|------------------|---|
| Normal range: | Reference values from apparently healthy persons with no documented disease and medication: EDTA-plasma: <400 μmol/l Serum: <350 μmol/l Median: 372 μmol/l Each laboratory should establish own normal values |
| Linearity: | Up to 600 μmol/l l |
| Sample volume: | 10 μl human EDTA plasma, Serum and other Biological fluids |
| Incubation time: | 15 min |
| Detection Limit: | 7 μmol/l |

10) PRECISION

| | | | |
|----------------------|------------|----------------------|-------------|
| Intra-Assay (n = 12) | | Inter-Assay (n = 12) | |
| Mean (μmol/l) | 221 μmol/l | Mean (μmol/l) | 221 μmol/l |
| SD | 6.9 μmol/l | SD | 11.3 μmol/l |
| CV% | 3.1% | CV% | 5.1% |

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots
- Do not use reagents beyond expiration date. Protect reagents from direct sunlight.
- Avoid foaming when mixing reagents
- Stop solution should be added to the plate in the same order as the reaction-mix solution

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested with 3rd generation tests against HIV-Ab and HBsAg; and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

All liquid reagents contain 0.01%Proclin 300 as preservative.

Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 300 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions-avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where reagents are used.
- Avoid all contact with the reagents by using gloves.
- Sulfuric acid is irritating to eyes and skin. Flush with water if contact occurs. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible - Flush with water after contact!!

13) LITERATURE

- Montine et al., American Journal of Pathology (1999) 155: 863-868
- Roozendaal et al., Clin. Exp. Immunol. (1999) 116: 206-213
- Smolle K.H. et al., Abstracts of the 7th Vienna Shock Forum (1999)
- Reifenbach et al. Antioxidants & Redox Signaling, 4, Nr.3 2002 p456-469
- Hildebrandt W, et al. Blood 2002; 99: 1552-5
- Schimke I, et al. J. Am. CollCardiol. 2001; 38: 178-83

1) EINLEITUNG

Zellen und Gewebe sind gegenüber Oxidativen Stress empfindlich, welcher durch freie Radikale verursacht wird. Werden diese Radikale nicht deaktiviert, zB. durch Antioxidantien, entstehen organische Peroxide und Hydroperoxide, die mit Zellbestandteilen reagieren und diese schädigen können Die Bestimmung des Oxidativen Status bzw. Stress ist in der modernen Medizinischen Forschung und Diagnose sehr wichtig. Bisher wurden Methoden wie die HPLC, oder die Bestimmung von Abbauprodukten von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (zB. TBARS Thiobarbitursäure und reaktive Substanzen) verwendet.

Der Biomedica OxyStat Testkit misst die gesamte Peroxid Konzentration der Probe unter Verwendung einer schnellen und einfachen kolorimetrischen Methode. Die Ergebnisse stehen in direktem Zusammenhang mit freien Radikalen und zirkulierendem biologischen Peroxiden. Daher kann der Oxidativen Status einer biologischen Proben mit diesem Testkit ermittelt werden..

MÖGLICHE INDIKATIONEN

- Cardiovasculäre Erkrankungen
- Arteriosklerose
- Sepsis
- Karzinogenese
- Entzündliche Prozesse
- Neurodegenerative Prozesse

2) INHALT DES KITS

| CONT | KIT KOMONENTEN | MENGE |
|----------|---|--------------------------|
| PLATE | Mikrotiterstreifen im Streifenhalter | 12 x 8Teste |
| SOLA | Lösung A, Probenpuffer, gebrauchsfertig | 1 x 25 ml |
| SOLB | Lösung B, Reaktionspuffer, gebrauchsfertig | 1 x 1ml |
| SOLC | Lösung C, Enzymlösung, gebrauchsfertig | 1 x 50 µl |
| SOLD | Lösung D, Reaktionslösung, gebrauchsfertig | 1 x 5 ml |
| CTRL 1+2 | Kontrollen, lyophilisiert, genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett | 2 x 1 vial Lyophilisiert |
| CAL | Kalibratoren, lyophilisiert, genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett | 3 x1 vial Lyophilisiert |
| STOP | Stopplösung H2SO4, gebrauchsfertig | 1 x 6 ml |

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- Arbeitsanleitung (Beipacktext)
- Protokoll Blatt

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 5-5000 µl, inkl. Pipettenspitzen
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (620 nm Referenz)
- Inkubator für 37°C

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Wir empfehlen EDTA Plasma für die Messung, da in Serum ein zeitabhängiger Anstieg der Peroxid-Konzentration beobachtet wurde. Wenn Serum verwendet werden soll, so darf nach der Blutabnahme eine Gerinnungszeit von 30 min nicht überschritten werden. Plasma und Serumproben sollten bei -20°C gelagert werden. Heparinplasma kann nicht eingesetzt werden, da es häufig zu einem Nachgerinnen der Proben bei der Lagerung kommt, welche die Ergebnisse verfälscht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Trübe Proben sind vor Verwendung im Test mindestens 5 Minuten bei 5000xg zu zentrifugieren.

Rekonstituieren Sie:

- CTRL (Kontrollen) /CAL (Kalibrator): Pipettieren Sie 250 μl SOLD (Reaktionslösung) in ein Röhrchen CAL bzw. je Röhrchen CTRL. Bei Raumtemperatur ($18-26^{\circ}\text{C}$) 45 Minuten lösen lassen, gut mischen. Rekonstituierte CAL und CTRL können aliquotiert werden und sind bei -20°C bis zu 1 Monat haltbar.

Folgende Mengen an ABC-Reaktionsmischung reichen für 40 Bestimmungen (Wells). Die Menge an Reaktionsmischung muss an die Anzahl der Bestimmungen adaptiert werden.

- 5 ml SOLA (Probenpuffer)+ 100 μl SOLB (Reaktionspuffer) + 5 μl SOLC (Enzymlösung)

Stellen Sie die ABC Reaktionsmischung unmittelbar vor der Verwendung her.

6) TESTPRINZIP

Die Peroxidasekonzentration wird durch die Reaktion der biologischen Peroxide mit Peroxidase bei gleichzeitiger Farbreaktion mit TMB als Substrat bestimmt. Nach Zugabe der Stopplösung wird die gefärbte Lösung in einem Mikrotiterplattenphotometer bei

450 nm gemessen. Mittels des Kalibrators wird die Konzentration der zirkulierenden biologischen Peroxide in der Probe berechnet (Ein-Punkt Kalibration)

7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden welche Raumtemperatur ($18-26^{\circ}\text{C}$) aufweisen

Markieren Sie die Positionen für CTRL/CAL/PROBE (Kontrolle/Kalibrator/Probe) am Protokollblatt

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Plastik Säckchen und beschriften Sie wie gewünscht. Nicht verwendete Streifen können im Plastik Säckchen gelagert werden.

Pipettieren Sie 10 μl CTRL/CAL /SAMPLE (Kontrolle/Kalibratotr/Probe) in die Mikrotiterstreifen

Pipettieren Sie 100 μl SOLA (Probenpuffer) in alle Wells

Messung 1: Bestimmung der Adsorption mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm

Pipettieren Sie 100 μl frisch hergestellte ABC Reaktionslösung in alle Wells. (siehe Punkt 5, Reagenzien und Probenvorbereitung)

15 Minuten bei 37°C inkubieren

Pipettieren Sie 50 μl STOP (Stopplösung) in alle Wells

Messung 2: Bestimmung der Adsorption mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm

Testprotokoll bei Verwendung von Pipettier- Automaten

- Adjustieren Sie die Mengen der Reaktionslösungen und Proben je nach verwendetem Automaten..
- Falls die Stopplösung nicht automatisch zugegeben werden kann, empfehlen wir eine Kinetische Messung bei 450 nm oder 580 – 620 nm ohne stoppen der Reaktion.
- Messzeit: 15 Minuten bei $20 - 37^{\circ}\text{C}$.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die Differenz der OD der Messung 1 und 2 ist proportional der Peroxidkonzentration der Probe.

- Subtrahieren Sie die OD Werte der Messung 1 von den Werten der Messung 2 (Delta OD), sowohl von der Kontrolle, dem Kalibrator als auch allen Proben.
- Unter Verwendung des CAL (Kalibrators) wird eine Ein-Punkt Kalibrierung gemacht. Die erhaltenen OD Werte sind proportional zur Konzentration. Die Konzentration des Kalibrators ist am Etikett in H₂O₂ Äquivalenten µmol/l angegeben.
- Die Konzentration der Proben wird nach folgender Formel berechnet:

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

9) TESTMERKMALE

| | |
|--------------------|--|
| Normalwerte: | Normalwerte von gesunden Personen welche keine Dokumentierten Krankheiten oder Medikamentöse Behandlungen haben. EDTA Plasma <400 µmol/l Serum <350 µmol/l Jeder Verwender sollte den Normalbereich seiner Proben evaluieren. |
| Linearität | Bis zu 600 µmol/l |
| Probenvolumen: | 10 µl human EDTA plasma, Serum and other Biological fluids |
| Inkubationszeiten: | 15 Min |
| Detektionsgrenze: | 7 µmol/l |

10) PRÄZISION

| | |
|-----------------------|------------|
| Intra-Assay (n = 12) | |
| Durchschnitt (µmol/l) | 221 µmol/l |
| SD | 6,9 µmol/l |
| VK% | 3,1% |

| | |
|-----------------------|-------------|
| Inter-Assay (n = 12) | |
| Durchschnitt (µmol/l) | 221 µmol/l |
| SD | 11,3 µmol/l |
| VK% | 5,1% |

11) TECHNISCHE HINWEISE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Testen dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel oder Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden. Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN.

Alle Bestandteile Humanen Ursprunges wurden mit Testen der 3.Generation auf HIV Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0,01% Proclin 300 als Konservierungsmittel.

Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 300 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien
- Verwenden Sie Handschuhe zur Vermeidung jedes Kontaktes zu Reagenzien.
- Schwefelsäure reizt die Augen und die Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

- Montine et al., American Journal of Pathology (1999) 155: 863-868
- Roozendaal et al., Clin. Exp. Immunol. (1999) 116: 206-213
- Smolle K.H. et al., Abstracts of the 7th Vienna Shock Forum (1999)
- Reifenbach et al. Antioxidants & Redox Signaling, 4, Nr.3 2002 p456-469
- Hildebrandt W, et al. Blood 2002; 99: 1552-5
- Schimke I, et al. J. Am. CollCardiol. 2001; 38: 178-83

1) INTRODUCTION

Les cellules et les tissus sont sensibles au stress oxydant, résultat de la formation de radicaux libres. S'ils ne sont pas désactivés par les anti-oxydants, les peroxydes organiques et les hydroperoxydes sont les premiers produits des réactions entre les constituants cellulaires et les radicaux libres ou autres réactifs dérivés d'oxygène.

La détermination du statut oxydant ou du stress oxydant est essentielle aujourd'hui dans la recherche médicale et le diagnostic clinique. Les méthodes utilisées actuellement sont ou coûteuses (HPLC), ou capables de détecter uniquement les produits de dégradation des acides gras poly-insaturés, comme TBARS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique).

L'essai OxyStat de Biomedica mesure la concentration totale des peroxydes dans un échantillon, employant une procédure simple et rapide. Les résultats démontrent une corrélation directe entre les radicaux libres et les peroxydes biologiques circulants, permettant ainsi la détermination du statut oxydant dans les échantillons biologiques.

Indications possibles

- Maladies cardiovasculaires
- Arteriosclérose
- Septicémie
- Carcinogénèse
- Processus inflammatoires
- Processus neurogénérateurs

2) CONTENU DE LA TROUSSE

| CONT | COMPOSANTS DE LA TROUSSE | QUANTITE |
|------------|---|-------------------------|
| PLATE | Barrettes de microtitration avec portoir pour barrettes | 12 x 8 tests |
| SOLA | Solution A, Tampon échantillon, prêt à l'emploi | 1 x 25 ml |
| SOLB | Solution B, Tampon de réaction, prêt à l'emploi | 1 x 1 ml |
| SOLC | Solution C, Solution d'enzyme, prêt à l'emploi | 1 x 50 µl |
| SOLD | Solution D, Solution de reconstitution, prêt à l'emploi | 1 x 5 ml |
| CTRL 1 + 2 | Contrôles, lyophilisés. La concentration après reconstitution est indiquée sur l'étiquette | 2 x 1 flacon lyophilisé |
| CAL | Calibrants, lyophilisés. La concentration après reconstitution est indiquée sur l'étiquette | 3 x 1 flacon lyophilisé |
| STOP | Solution STOP, acide sulfurique, prêt à l'emploi | 1 x 6 ml |

3) MATERIEL ADDITIONNEL AJOUTE A LA TROUSSE

- Notice d'utilisation
- Feuille de protocole

4) MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Micropipettes de précision calibrées pour délivrer 5-5000µl et embouts jetables
- Lecteur de microplaques ELISA pour lire l'absorbance à 450nm
- Incubateur réglé à 37°C

5) PREPARATION DES REACTIFS ET DES ECHANTILLONS

Nous conseillons d'utiliser des échantillons de type plasma-EDTA car une concentration progressive dans le temps en peroxydes est observée dans le sérum. En cas d'utilisation du sérum, veillez à ne pas le laisser coaguler pendant plus de 30 minutes à température ambiante. Les échantillons sérum ou EDTA doivent être conservés à -20°C.

Le plasma hépariné ne doit pas être utilisé pour cet essai car il peut précipiter et entraîner la modification des résultats.

Les échantillons de type plasma-hépariné, lipémiques ou hémolysés peuvent fournir des résultats erronés.

Les échantillons troubles doivent être centrifugés au moins pendant 5 minutes à 5000xg avant utilisation.

Tous les échantillons doivent être bien mélangés avant l'essai.

Reconstituer comme suit :

- Dissoudre un calibrant et chaque contrôle dans 250 µl de la solution D et laisser à température ambiante (18-26°C) pendant cinq minutes. Bien mélanger. Le contrôle et le calibrant reconstitués peuvent être aliquotés et conservés à -20°C pour une durée de un mois.
- Le volume du mélange de réaction ABC décrit ci-dessous est suffisant pour 40 tests (puits) et doit être utilisé comme guide. Cependant, le volume doit être ajusté au nombre d'échantillons. Préparer le mélange de réaction ABC immédiatement avant l'essai :
5 ml solution A + 100 µl solution B + 5 µl solution C

6) PRINCIPE DE L'ESSAI

La concentration en peroxydes est déterminée par la réaction des peroxydes biologiques avec la peroxidase et par une réaction de coloration utilisant la TMB comme substrat. Après l'addition d'une solution Stop, le liquide coloré est mesuré photométriquement à 450 nm. Un calibrant est utilisé pour calculer la concentration des peroxydes biologiques circulants dans l'échantillon (Calibration en un point).

7) PROTOCOLE DE L'ESSAI

| |
|---|
| Tous les réactifs et échantillons doivent être à température ambiante (18-26°C) avant l'utilisation |
|---|

| |
|--|
| Marquer la position du CAL/SAMPLE (Calibrant/Echantillon) sur la feuille du protocole. |
|--|

| |
|---|
| Sortir du sac plastique les barrettes de microtitration et marquer-les correctement. Conserver dans le sac les barrettes non-utilisées. |
|---|

| |
|---|
| Ajouter 10 µl du CAL/SAMPLE (Calibrant/Echantillon) dans leur puits respectif.. |
|---|

| |
|--|
| Ajouter 100 µl de la SOLA (Tampon d'échantillon Solution A) dans chaque puits. |
|--|

| |
|---|
| Mesure 1: Déterminer l'absorption avec un lecteur ELISA à 450 nm |
|---|

| |
|--|
| Ajouter 100 µl du mélange de réaction ABC dans tous les puits (voir section 5). Préparation des Réactifs et des Echantillons). |
|--|

| |
|--|
| Incuber pendant 15 minutes à 37°C |
|--|

| |
|--|
| Rajouter 50 µl de STOP (Solution Stop) dans chaque puits |
|--|

| |
|---|
| Mesure 2: Déterminer l'absorption avec un lecteur ELISA à 450 nm |
|---|

Procédure de l'essai pour des systèmes de pipettage automatisés:

- Ajuster les volumes des solutions de réaction et des échantillons selon l'automate utilisé.
- Si l'automate est incapable d'ajouter la solution Stop, mesurer à 405nm ou à 580 – 620 nm en mode cinétique sans arrêter la réaction.
- Durée de la mesure : 15 minutes à 20 - 37°C.

8) CALCUL DES RESULTATS

La différence entre la mesure 1 et la mesure 2 est proportionnelle aux concentrations des peroxydes dans les échantillons.

- Pour chaque CTRL/CAL/SAMPLE (Contrôle/Calibrant/Echantillon) soustraire les valeurs OD de la mesure 1 des valeurs OD de la mesure 2 (=ΔOD)
- La calibration en un point est effectuée en employant le CAL (Calibrant). La valeur OD est proportionnelle à la concentration indiquée sur l'étiquette. Cette concentration est définie en équivalents H₂O₂ (μmol/l).
- Les concentrations des contrôles et des échantillons sont calculées selon la formule suivante:

$$[\mu\text{mol} / \text{l}] = \frac{\Delta \text{OD échantillon} \times [\mu\text{mol} / \text{l}] \text{ calibrant}}{\Delta \text{OD calibrant}}$$

9) CARACTÉRISTIQUES DE L'ESSAI

| | |
|---------------------------|---|
| Valeurs normales : | Valeurs de référence pour les sujets apparemment en bonne santé sans maladies documentées ni sous médicaments : Plasma EDTA : <400 μmol/l Sérum : <350 μmol/l Médian : 372 μmol/l Chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs normales |
| Linéarité : | Jusqu'à 600 μmol/l l |
| Volume de l'échantillon : | 10 μl de plasma EDTA humain, de sérum et d'autres fluides biologiques |
| Temps d'incubation : | 15 min |
| Limite de détection : | 7 μmol/l |

10) PRÉCISION

| | | | |
|----------------------|------------|----------------------|-------------|
| Intra-essai (n = 12) | | Inter-essai (n = 12) | |
| Moyenne (μmol/l) | 221 μmol/l | Moyenne (μmol/l) | 221 μmol/l |
| SD | 6,9 μmol/l | SD | 11,3 μmol/l |
| CV% | 3,1% | CV% | 5,1% |

11) CONSEILS TECHNIQUES

- Ne pas remplacer ou mélanger les réactifs fournis avec ce kit avec ceux de lots ou de sources différents.
- Ne pas mélanger les bouchons de réactifs différents ou utiliser des réactifs d'autres lots.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date d'expiration. Protéger les réactifs contre la lumière directe du soleil.
- La solution Stop doit être ajoutée dans la microplaque dans le même ordre que le mélange de réaction ABC.
- Éviter la formation de mousse pendant le mélange des réactifs.

12) PRECAUTIONS

Les produits d'origine humaine utilisés dans cette trousse ont été testés avec des essais de troisième génération contre le VIH-Ab et l'AgHbs et ont été trouvés négatifs. Cependant, ils doivent être manipulés comme étant susceptibles de transmettre des maladies infectieuses.

Tous les réactifs en liquide contiennent 0,01% Proclin 300 comme conservateur. Eviter tout contact avec la peau et la muqueuse. Proclin 300 n'est pas toxique dans les concentrations utilisées dans cette trousse. Cependant, il peut entraîner les réactions allergiques et tout contact avec la peau ou les yeux doit être évité.

- Ne pas pipetter avec la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer, ni appliquer les produits cosmétiques pendant la manipulation des réactifs
- Porter les gants pour éviter tout contact avec les réactifs.
- L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Laver avec de l'eau en cas de contact. Eviter le contact avec la peau et la muqueuse. Les irritations sont possibles – laver avec de l'eau après contact!!

13) LITERATURE

- Montine et al., American Journal of Pathology (1999) 155: 863-868
- Roozendaal et al., Clin. Exp. Immunol. (1999) 116: 206-213
- Smolle K.H. et al., Abstracts of the 7th Vienna Shock Forum (1999)
- Reifenbach et al. Antioxidants & Redox Signaling, 4, Nr.3 2002 p456-469
- Hildebrandt W, et al. Blood 2002; 99: 1552-5
- Schimke I, et al. J. Am. CollCardiol. 2001; 38: 178-83

1) INTRODUCCION

Las células y tejidos son sensibles al estrés oxidativo, originado por la formación de radicales libres. Si no son desactivados por antioxidantes, los peóxidos e hidroperóxidos orgánicos son los primeros productos de la reacción entre los constituyentes celulares y otros radicales libres u otros derivados activos del oxígeno.

La determinación de la relación estado oxidativo/estrés oxidativo es esencial hoy día en el diagnóstico e investigación médica. Los métodos utilizados para la determinación, o bien son muy caros (HPLC), o bien únicamente detectan productos de la degradación de ácidos grasos poliinsaturados, como el TBARS (sustancias reactivas al ácido triarbitúrico).

El ensayo OxyStat de Biomédica cuantifica la concentración de peróxidos totales en la muestra, utilizando un ensayo rápido y sencillo. Los resultados muestran una correlación directa entre los radicales libres y los peróxidos biológicos circulantes y permiten así la caracterización del nivel oxidativo en las muestras biológicas.

INDICACIONES POSIBLES

- Enfermedad Cardiovascular
- Arterioesclerosis
- Sepsis
- Procesos carcinógenos
- Procesos neurogenerativos
- Procesos inflamatorios

2) CONTENIDO DEL KIT

| CONT | COMPONENTES DEL KIT | CANTIDAD |
|-----------|---|------------------------|
| PLATE | Tiras de micropocillos incluidas en su soporte | 12 x 8 tests |
| SOLA | Solución A, tampón de ensayo, listo para usar | 1 x 25 ml |
| SOLB | Solución B, tampón de reacción, listo para usar | 1 x 1 ml |
| SOLC | Solución C, solución enzimática, lista para usar | 1 x 50 µl |
| SOLD | Solución D, solución para la reconstitución, lista para usar | 1 x 5 ml |
| CTRL 1+ 2 | Controles, liofilizado. La concentración tras la reconstitución se indica en la etiqueta | 2 x 1 vial liofilizado |
| CAL | Calibrador, liofilizado. La concentración tras la reconstitución se indica en la etiqueta | 3 x 1 vial liofilizado |
| STOP | Solución de parada, ácido sulfúrico, lista para usar | 1 x 6 ml |

3) MATERIAL ADICIONAL ICLUIDO EN EL KIT

- Manual de instrucciones
- Hoja con el esquema de la placa

4) EQUIPAMIENTO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipetas de precisión calibradas de 5-5000 µl y puntas desechables
- Lector de Elisa con capacidad para leer absorbancias a 450 nm.
- Incubador de 37°C

5) PREPARACION DE LOS REACTIVOS Y DE LAS MUESTRAS

La concentración de peróxido se determina por la reacción de los peróxidos biológicos con la peroxidasa y posterior reacción de color. Se recomienda la utilización de muestras de plasma EDTA como muestra tipo ya que en el suero se observa un incremento en las concentraciones de peróxido asociado al tiempo. Cuando se trabaja con muestras de suero, asegurarse de que el tiempo transcurrido durante la preparación no supere los 30 minutos a temperatura ambiente para asegurar la formación del coágulo. Almacenar las muestras de suero o de plasma EDTA a -20°C.

No se recomienda utilizar muestras de plasma heparinizado con este ensayo ya que a menudo precipitan incluso durante el almacenamiento produciendo cambios en los resultados.

Las muestras de plasma heparinizadas, así como las muestras con elevado contenido en lípidos o hemolizadas pueden conducir a resultados erróneos.

Las muestras que presenten turbidez deberían centrifugarse al menos durante 5 minutos a 5000x g antes de su utilización en el ensayo.

Todas las muestras deben mezclarse bien antes de su utilización en el ensayo.

Reconstituir como se detalla:

- Disolver un calibrador y cada control en 250 µl de solución D y dejar reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente (18-26°C), mezclar bien. Los CAL y los CTRL reconstituidos pueden alícuotarse y almacenarse a -20°C hasta un mes.
- El volumen de la mezcla de reacción ABC que se indica a continuación es suficiente para 40 determinaciones (pocillos) y debería utilizarse como guía. Debería sin embargo adaptarse este volumen al número de muestras para el ensayo.
- Preparar la mezcla de reacción-ABC inmediatamente antes de su utilización en el ensayo, a partir de la siguiente mezcla:
- 5 ml solución A + 100 µl solución B + 5 µl de solución C

6) PRINCIPIO DEL ENSAYO

La concentración de peróxido se determina por la reacción de los peróxidos biológicos con la peroxidasa y posterior reacción de color utilizando TMB como sustrato. Tras la adición de la solución de parada, se mide la absorbancia del líquido coloreado fotométricamente a 450 nm.

Se utiliza un calibrador para calcular la concentración de los peróxidos biológicos circulantes en la muestra (calibración en un punto).

7) PROTOCOLO DEL ENSAYO

Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente (18-26°C) antes de utilizarse en el ensayo.

Marcar la posición de CAL/SAMPLE (Calibrador/muestra) en la hoja del esquema de la placa

Sacar las tiras de micropocillos de la bolsa de plástico, y rotular adecuadamente. Almacenar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico

Añadir 10 µl de CAL/SAMPLE (Calibrador/muestra) en los pocillos respectivos.

Añadir 100 µl de SOLA (Solución A, tampón de ensayo) a cada pocillo

Cuantificación 1: Determinar la absorbancia con un lector de Elisa a 450nm

Añadir 100 µl de la mezcla de reacción ABC a todos los pocillos (ver sección 5), reactivos y preparación de la muestra.

Incubar 15 minutos a 37°C

Añadir 50 µl de STOP (Solución de Parada) a cada pocillo

Cuantificación 2: Determinar la absorbancia con un lector de Elisa a 450nm

Procedimiento del ensayo para sistemas de pipeteo automatizado

- Ajustar los volúmenes de las soluciones para la reacción y de las muestras de acuerdo con el sistema de análisis utilizado
- Si el analizador automático no está preparado para añadir la solución de parada, realizar las cuantificaciones para la cinética a 405 nm o a 580-620 nm sin parar la reacción
- Tiempo para la cuantificación: 15 minutos a 20-37°C

8) CALCULO DE LOS RESULTADOS

Las diferencias entre la cuantificación 1 y la cuantificación 2 son proporcionales a las concentraciones de peróxido de las muestras.

- Para cada CTRL/CAL/SAMPLE (Control/Calibrador/Muestra) restar los valores de la DO de la cuantificación 1 de los valores de la DO de la cuantificación 2 (OD muestra)
- Utilizando el CAL (calibrador) se realiza una calibración con un único punto. El valor de la DO es proporcional a su concentración, indicada en la etiqueta del vial. Esta concentración se indica en equivalentes de H₂O₂ (mol/l).
- Las concentraciones de los controles y de las muestras se calculan de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$[\mu \text{ mol / l}] \text{ muestra} = \frac{\Delta \text{OD muestra} \times [\mu \text{ mol / l}] \text{calibrador}}{\Delta \text{OD calibrador}}$$

9) CARACTERISTICAS DEL ENSAYO

| | |
|-----------------------|---|
| Rango de Normalidad: | Valores de referencia obtenidos de personas aparentemente sanas en las que no se ha documentado enfermedad ni medicación: Plasma-EDTA: <400 $\mu\text{mol/l}$ Suero: < 350 $\mu\text{mol/l}$ Mediana: 372 $\mu\text{mol/l}$ Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad. |
| Linealidad: | Hasta 600 $\mu\text{mol/l}$ |
| Volúmen muestra: | 10 μl de plasma-EDTA humano, suero y otros fluidos biológicos |
| Tiempo de Incubación: | 15 min |
| Límite de detección: | 7 $\mu\text{mol/l}$ |

10) PRECISION

| | | | |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------|
| Intra-Ensayo (n = 12) | | Inter-Ensayo (n = 12) | |
| Media ($\mu\text{mol/l}$) | 221 $\mu\text{mol/l}$ | Media ($\mu\text{mol/l}$) | 221 $\mu\text{mol/l}$ |
| SD | 6,9 $\mu\text{mol/l}$ | SD | 11,3 $\mu\text{mol/l}$ |
| CV% | 3,1% | CV% | 5,1% |

11) OBSERVACIONES TECNICAS

- No mezclar o sustituir reactivo procedentes de diferentes lotes o fabricantes
- No mezclar los tapones de los viales de diferentes reactivos o de reactivos de diferentes lotes
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad. Proteger los reactivos de la acción directa de la luz solar.
- Evitar la formación de espuma al mezclar los reactivos.
- La solución de parada debería añadirse a la placa en el mismo orden que la solución con la mezcla de los reactivos.

12) PRECAUCIONE

Todos los componentes de procedencia humana fueron testados con ensayos de 3ª generación frente a la presencia de anticuerpos HIV y al antígeno de superficie de la Hepatitis B; con resultado negativo. Sin embargo, deberían manipularse y eliminarse como si se tratara de material potencialmente infeccioso.

Todos los reactivos líquidos contienen Proclina 300 al 0.01% como conservante. Evitar el contacto con la piel ó con las membranas mucosas. La Proclina 300 no es tóxica en las concentraciones empleadas en este kit. Puede provocar reacciones alérgicas en la piel, evitar el contacto con la piel ó los ojos.

- No pipetear con la boca.
- No comer o beber o aplicarse cosméticos en las zonas de manipulación de los reactivos.
- Evitar el contacto con los reactivos utilizando guantes.
- El ácido sulfúrico es irritante para los ojos y la piel. Enjuagar con abundante agua si se produce contacto. Evitar el contacto con la piel y con las membranas mucosas . Puede presentarse irritación. Si tine lugar un contacto, enjuagar con abundante agua.

13) LITERATURE

- Montine et al., American Journal of Pathology (1999) 155: 863-868
- Roozendaal et al., Clin. Exp. Immunol. (1999) 116: 206-213
- Smolle K.H. et al., Abstracts of the 7th Vienna Shock Forum (1999)
- Reifenbach et al. Anitoxidants & Redox Signaling, 4, Nr.3 2002 p456-469
- Hildebrandt W, et al. Blood 2002; 99; 1552-5
- Schimke I, et al. J. Am. CollCardiol. 2001; 38; 178-83

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use) / In vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik) / Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro) / Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro) / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (Para utilização de diagnóstico "in vitro") / Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (Voor diagnostisch gebruik in vitro) / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse) / Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (För in vitro-diagnostiskt bruk) / Wyrób medyczny do Diagnostyki In Vitro / In vitro orvosdiagnostikai termék / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené pre diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobena



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalógové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazena a entre / Bewaar bij tussen / Opbevaars mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenido suficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Indeholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pro x testů

BI-5007 OXYSTAT

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

- Bring all reagents to room temperature (18 – 26°C)
- Prepare reagents and samples as instructed
- Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert
- Take microtiter strips out of the bag and mark positions on the protocol sheet
- Add 10 µl CTRL/CAL/SAMPLE (control/calibrator/sample) into each well, except blank
- Add 100 µl SOLA (solution A sample buffer) into each well
- Measurement 1: Determine adsorption with an Microtiterplate reader at 450 nm**
- Add 100 µl freshly prepared ABC reaction mix into each well.
- Incubate at 37°C for 15 minute**
- Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well
- Measurement 2: Determine adsorption with an Microtiterplate reader at 450 nm**