

Albumin ELISA Kit

Super sensitiv

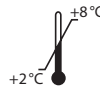
Zur in-vitro-Bestimmung von Albumin in Urin und Stuhl

Super sensitive

For the in vitro determination of albumin in urine and stool

Gültig ab / Valid from 2015-01-14

REF **K 6330**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Spezifität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Albumin aus Urin und Stuhl geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Veränderungen der Albuminkonzentration im Urin und Stuhl sind im Wesentlichen eine Folge von Verteilungsstörungen, weniger von Synthesestörungen. Bei Nahrungsentzug fällt die Konzentration frühestens nach einer Woche unter den unteren Referenzbereichswert. Bei Proteinmangelernährung korreliert das Ausmaß der Ödeme nur schwach mit der Albuminkonzentration. Stärkerer Albuminverlust nach außen, z.B. beim nephrotischen Syndrom, führt zur gesteigerten Synthese.

Erhöhte Albumin- wie auch Hämoglobinkonzentrationen im Stuhl werden nicht nur bei kolorektalen Karzinomen, sondern auch bei Polypen und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa) beobachtet.

Indikationen

- Nachweis von Blutungsquellen im unteren Gastrointestinaltrakt
- Erkennung kolorektaler Karzinome
- Untersuchung von Risikogruppen
- Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6330	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6330	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 6330	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6330	CONJBUF	Konjugat-Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6330	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5x	1 x 100 ml
K 6330	CONJ	Konjugat, (Kaninchen anti Albumin, Peroxidase-markiert)	1 x 50 µl

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6330	STD	Standards, lyophilisiert (0; 12.5; 50; 200; 800 ng/ml)	4 x 5 vials
K 6330	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 6330	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 6330	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6330	STOP	ELISA-StoppLösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an-zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.

- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Das **Extraktionspufferkonzentrat** **IDK Extract®** (EXBUF) muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 150 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Extraktionspufferkonzentrat** **IDK Extract®** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Extraktionspuffer) ist bei **2–8°C drei Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und Kontrollen werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können nicht gelagert werden.**
- Das **Konjugatkonzentrat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:401 in Konjugat-Verdünnungspuffer** verdünnt (25 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Das Konzentrat ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Urin

Zur Lagerung sind die Urine mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6 und 8 einzustellen. Die Proben können bis zu zwei Wochen bei 2–8°C gelagert werden. Bei längerer Lagerung müssen die Proben bei -20°C aufbewahrt werden.

Proben 1:200 mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) verdünnen, z.B. 10 µl Probe + 1990 µl SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer).

Stuhlprobenextraktion

Der **verdünnte Extraktionspuffer IDK Extract®** wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 1,5 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	1,5 ml
Verdünnungsfaktor:	1:100

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o.Ä.
- Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer **IDK Extract®** **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- Röhrchen aufschrauben (orangefarbenes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstecken in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- Das Röhrchen solange mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres „Einweichen“ (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u.Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (blauer Ring) zu-

sammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung I **1:100**

Probenverdünnung

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:2,5** mit **Probenverdünnungspuffer** (SAMPLEBUF) weiterverdünt. Zum Beispiel:

- **200 µl** Überstand (Verdünnung I) + **300 µl** Probenverdünnungspuffer, mischen = **1:2,5 (Verdünnung II)**
Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von **1:250**

100 µl der **Verdünnung II** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von humanem Albumin in Urin und Stuhl.

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf Albumin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem anti-human-Albumin-Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Albumin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (peroxidase-markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes Albumin – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Albumin-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen, nicht verwendete können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische

Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen 5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl STD (Standard) SAMPLE (Probe) CTRL (Kontrollen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl verdünntes CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15-30°C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, mischen.
11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Urin

Der ermittelte Albuminwert wird mit **200** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Stuhl

Der ermittelte Albumin-Spiegel der Stuhlproben wird mit dem Verdünnungsfaktor **250** multipliziert.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

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

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Stuhlproben von augenscheinlich Gesunden (n = 76) wurden folgender Referenzwert ermittelt.

Stuhl: < 9,2 mg/l

Urin: < 20 mg/l*

*Leistungskatalog Labor Limbach, Heidelberg, <http://www.labor-limbach.de>

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit von einer Probe innerhalb einer Messserie wurde geprüft.

Intra-Assay (n = 20)

Probe	Albumin [mg/l]	VK [%]
1	50	5

Die Reproduzierbarkeit von einer Probe an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft.

Inter-Assay (n = 20)

Probe	Albumin [mg/l]	VK [%]
1	50	8

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 12,5 ng/ml.

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen gefunden.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.

H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigelegten 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.
- 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.

15. LITERATUR

1. Trasch und Bloch 1993; Klin. Lab.39, 479-484.
2. John et al., 1994; Klin.Lab. 40, 77-81.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

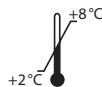
Albumin ELISA Kit

Super sensitive

For the in vitro determination of Albumin in urine and stool

Valid from 2015-01-14

REF K 6330



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	15
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	16
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	17
<i>Extraction of the stool samples</i>	17
<i>Dilution of samples</i>	18
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	19
8. RESULTS	20
9. LIMITATIONS	21
10. QUALITY CONTROL	21
<i>Reference range</i>	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Precision and reproducibility</i>	22
<i>Analytical Sensitivity</i>	22
<i>Specificity</i>	22
12. PRECAUTIONS	23
13. TECHNICAL HINTS	23
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of albumin in urine and stool. For *in vitro* diagnostic.

2. INTRODUCTION

Albumin is the major protein in human plasma (40-60%). It is synthesized in the liver depending of the protein uptake. Albumin in fecal samples refers to an inflammatory reaction combined with intestinal bleeding. Elevated levels of albumin and hemoglobin in stool are found not only by colorectal carcinomas, but also with polyps and during chronic inflammatory diseases (Morbus Crohn or Colitis Ulcerosa).

Indications

- Detection of source of bleeding in the lower gastrointestinal tract
- Detection of colorectal carcinoma
- Investigation of high risk patients
- Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6330	PLATE	Precoated strips	96 wells
K 6330	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate (10x)	1 x 100 ml
K 6330	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 100 ml
K 6330	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready to use	1 x 15 ml
K 6330	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract</i> ®, 2.5x	1 x 100 ml
K 6330	CONJ	Conjugate, (rabbit-anti-Albumin peroxidase-labeled)	1 x 50 µl
K 6330	STD	Calibrators, lyophilized (0, 12.5, 50, 200, 800 µg/l)	4 x 5 vials
K 6330	CTRL	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K 6330	CTRL	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K 6330	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6330	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- The **extraction buffer concentrate** *IDK Extract*[®] must be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml concentrate + 150 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37 °C in a water bath. The **extraction buffer concentrate** *IDK Extract*[®] is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** (extraction buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for three months**.
- The **lyophilized standards** (STD) and **controls** (CTRL) are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the standards and controls

must be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls are not stable and cannot be stored.**

- The **conjugate concentrate** (CONJ) must be diluted **1:401 in conjugate dilution buffer** (25 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The concentrate is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Urine

Adjust urine to a pH 6 to 8 with 1 N NaOH. Samples can be stored for two weeks at 2–8 °C or at -20 °C for longtime storage.

For the assay, dilute samples **1:200** with **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer), e.g. 10 µl sample + 1990 µl SAMPLEBUF.

Extraction of the stool samples

Diluted extraction buffer *IDK Extract*[®] is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instructions for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer.

SAS with 1.5 ml extraction buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	1.5 ml
Dilution Factor:	1:100

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, ino-

cultulation loop or similar device.

- b) Fill the **empty sample tube** with **1.5 ml** of ready to use *IDK Extract*[®] extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (orange part of cap) to open. Insert the orange dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution I: 1:100

Dilution of samples

The supernatant of the sample preparation procedure (dilution I) is diluted **1:2.5 in sample dilution buffer** (SAMPLEBUF). For example:

- **200 µl** supernatant (dilution I) + **300 µl** sample dilution buffer = **1: 2.5 (dilution II)** .

This results in a final dilution of **1:250**.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution II** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is a two step assay for the ultra sensitive determination of human albumin in stool and urine. A polyclonal rabbit antibody specific for human albumin is immobilized on a microtiter plate and a second anti-albumin antibody is conjugated to peroxidase.

In a first incubation step, the albumin in the samples is bound to the immobilized anti-albumin antibodies. A washing step is carried out to remove all unbound substances. In a second incubation step, a peroxidase-labeled anti-albumin antibody is added. After another washing step, to remove all unbound substances, a peroxidase-substrate, tetramethylbenzidine, is added. The enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution, whereby the color converts from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of albumin in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated using the results obtained from the calibrators. Albumin in the patient samples is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all reagents and samples to room temperature (15–30°C) and mix well.

Mark the positions of STD (Standard) SAMPLE (Sample) CTRL (Controls) on a protocol sheet.

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.	Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (wash-buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add 100 µl of STD (standard) SAMPLE (sample) CTRL (controls) into respective well.
3.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal shaker.
4.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (washbuffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl diluted CONJ (conjugate) into each well.
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal shaker.

7.	Discard the contents of each well. Wash each well 5 x by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (washbuffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well.
9.	Incubate for 10–20 min* at room temperature (15–30 °C) in the dark.
10.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, mix.
11.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform.

For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the “4 parameter algorithm”.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the

duplicate values should be evaluated manually.

Urine

The obtained albumin levels of urine samples have to be multiplied with the dilution factor of **200**.

Stool

The obtained albumin levels of stool samples have to be multiplied with the dilution factor of **250**.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used to get the real concentration.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range must be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

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 stool samples of apparently healthy persons (n = 76), the following reference range was estimated.

Albumin in stool: < 9.2 mg/l

Albumin in urine: < 20 mg/l*

* Test information, Labor Limbach, Heidelberg, <http://www.labor-limbach.de>

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

The precision (intra-assay variation) was calculated from 20 replicate determinations on one sample.

Sample	Albumin [mg/l]	CV [%]
1	50	5

Inter-Assay (n = 20)

The total precision (inter-assay variation) of was calculated from data on one sample obtained in 20 different assays.

Sample	Albumin [mg/l]	CV [%]
1	50	8

Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 12.5 ng/ml.

Specificity

No cross reactivity to other plasma proteins was observed.

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.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- 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.

- 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.

15. REFERENCES

1. Trasch and Bloch: 1993; Clin. Lab. 39, 479-484
2. John et al.: 1994; Clin. Lab. 40, 77-81

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