

Hämoglobin ELISA Kit

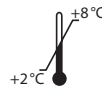
Zur in-vitro-Bestimmung von Hämoglobin in Stuhl

Hemoglobin ELISA Kit

For the in vitro determination of hemoglobin in stool

Gültig ab / Valid from 2015-03-23

REF K 7816D



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. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
<i>Probenstabilität und -lagerung</i>	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	12
<i>Allgemeine Literatur</i>	12
<i>Publikationen mit dem Immundiagnostik Hämoglobin-ELISA</i>	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Hämoglobin** in Stuhl geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Hämoglobin kann als Marker für gastrointestinale Blutungen verwendet werden. Die Untersuchung okkulten Blutes wird in den meisten Fällen zur Erkennung kolorektaler Karzinome durchgeführt.

Im Gegensatz zu handelsüblichen Hämoglobin Schnelltests, kann bei dem Hämoglobin ELISA auf eine vorgeschaltete Diäteeinhaltung (kein rohes Fleisch etc.) verzichtet werden. Durch die Antikörperwahl werden falsch-positive Ergebnisse nahezu ausgeschlossen.

Der immunologische Test erkennt humanes Hämoglobin in 100-fach niedrigerer Konzentration. Dadurch werden falsch-negative Ergebnisse vermieden.

Indikationen:

- Okkultes Blut im Stuhl
- Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa
- Verdacht auf Kolon Karzinom
- Polypen im Kolo-Rektum

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7816D	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 7816D	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7816D	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	1 x 100 ml
K 7816D	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 7816D	CONJ	Konjugat, (Maus-anti-human-Hb, per- oxidase markiert), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7816D	STD	Standards, lyophilisiert (50; 10; 3.3; 0.67; 0 µg/g)	4 x 5 vials
K 7816D	CTRL	Kontrollen, lyophilisiert	4 x 2 vials

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7816D	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7816D	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. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte 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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 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. Der **WASH-**

BUF kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat *IDK Extract***[®] muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml *IDK Extract*[®] + 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 *IDK Extract*[®] kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*[®]) ist bei **2–8 °C drei Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **CTRL** (Kontrollen) und **STD** (Standards) werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können nicht gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Probenstabilität und -lagerung

Rohstuhl kann **1 Monat** bei **-20 °C** gelagert werden.

Stuhlextrakt ist bei Raumtemperatur (15-30 °C) einen Tag, bei 2-8 °C sowie bei -20 °C fünf Tage haltbar. Die Extrakte sollten maximal drei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.

Stuhlprobenextraktion

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:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** gebrauchsfertigem *IDK Extract*[®] Extraktionspuffer **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) 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.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens - der türkisfarbene Ring zusammen mit dem Stäbchen - vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Die suspendierte Probe ist nun für die Verwendung im ELISA bereit. Die Probe kann auch in einen Pipettierautomaten eingesetzt werden. Dazu wird die Probe an die in der Arbeitsliste definierte Position im Samplerack gestellt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der vorliegende ELISA dient zur quantitativen Erfassung des humanen Hämoglobins im Stuhl. Proben und Standards werden in die mit anti-Hämoglobin-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterwells gegeben. Nach einer Inkubation wer-

den nicht-gebundene Komponenten durch einen Waschschrift entfernt. Das gebundene Antigen wird mittels eines Antikörper-POD/TMB-Systems nachgewiesen. Die Quantifizierung erfolgt durch Bestimmung der Extinktion bei 450 nm. 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 vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen . Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
2.	50 µl SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) in jede Vertiefung vorlegen.
3.	50 µl CTRL/STD/SAMPLE (Kontrolle/Standard/Probe) in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren (siehe beiliegende Plattenbelegung).
4.	1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
5.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen . Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
6.	100 µl Konjugat pro Vertiefung pipettieren.
7.	1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
8.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen . Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
9.	100 µl SUB (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren.
10.	10–20 Minuten bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren*

11.	100 µl STOP (Stopplösung) in jede Vertiefung pipettieren.
12.	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.

Stuhlproben

Da die Probenverdünnung in der Standardkurve bereits berücksichtigt wurde, ist der Verdünnungsfaktor gleich 1.

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 (Definition siehe unten) 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 \times *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität \times *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

Hämoglobin-Konzentration (Stuhl)*: **$< 2 \mu\text{g/ml} \triangleq < 2 \mu\text{g/g}$**

(1 g Stuhl \triangleq 1 ml)

* H.G. Bischoff et al., 1990. Okkultes Blut im Stuhl: Empfindlicher und spezifischer Nachweis durch immunologische Bestimmung von Human-Albumin und -Hämoglobin. *Ärztl. Lab.*, **36**. pp. 101–112.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 42)

Probe	Hämoglobin [µg/g]	VK [%]
1	3,99	4,75
2	7	2,53

Inter-Assay (n = 63)

Probe	Hämoglobin [µg/g]	VK [%]
1	0,863	8,16
2	3,501	4,76

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Patientenproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

Probe	Verdünnung	Hämoglobin erwartet [µg/g]	Hämoglobin gemessen [µg/g]
A	-	13,83	13,83
	1:2	6,92	6,74
	1:4	3,46	3,52
	1:8	1,73	1,61
B	-	17,74	17,74
	1:2	8,87	8,78
	1:4	4,44	4,47
	1:8	2,22	1,98

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 0,042 µg/ml.

Sensitivität, Spezifität, positiv- (PPW) und negativ-prädikative Werte (NPW) von drei Tests zum Nachweis von okkultem Blut im Stuhl (FOBTs) bei verschiedenen diagnostischen Gruppen.

Parameter	Guajak-Test	Streifen-IFOBT	ELISA-IFOBT
Sensitivität (%)			
Adenome	5.56 (0.14-27.29)	18.9 (3.58-41.42)	22.2* (6.41-47.64)
Karzinome	37.0 (24.29-51.26)	74.0* (60.35-85.04)	77.7* (64.40-87.96)
Karzinome + Adenome	29.1 (19.05-41.07)	59.7* (47.50-71.12)	63.8* (51.71-74.88)
Colitis ulcerosa	48.2 (29.45-67.47)	93.1 (77.23-99.15)	96.5 (82.24-99.9)
Morbus Crohn	42.1 (26.31-59.18)	94.7* (82.25-99.36)	94.7* (82.25-99.36)
Spezifität (%)			
Karzinome + Adenome	90.2 (84.64-94.32)	94.5 (89.84-97.46)	96.3* (92.21-98.65)
Colitis ulcerosa	90.9 (70.84-98.88)	95.4* (77.16-99.88)	95.4 (77.16-99.88)
Morbus Crohn	89.3 (79.36-95.63)	93.9* (85.20-98.32)	95.4* (87.29-99.05)
PPW (%)			
Adenome	5.9 (0.15-28.69)	25.0 (5.49-57.19)	40.0 (12.16-73.76)
Karzinome	55.6 (38.10-72.06)	81.6 (67.98-91.24)	87.5 (74.75-95.27)
Karzinome + Adenome	56.7 (39.49-72.90)	82.6 (69.67-91.77)	88.4 (76.56-95.65)
Colitis ulcerosa	87.5 (61.65-98.45)	96.4 (81.65-99.91)	96.6 (82.24-99.91)
Morbus Crohn	69.6 (47.08-86.79)	90.0 (76.34-97.21)	92.3 (79.13-98.38)
NPW (%)			
Adenome	89.7 (84.02-93.88)	91.2 (85.86-94.98)	91.9 (86.72-95.48)
Karzinome	81.3 (74.89-86.70)	91.7 (86.49-95.40)	92.9 (87.99-96.30)
Karzinome + Adenome	74.4 (67.72-80.28)	84.2 (78.16-89.18)	85.9 (79.99-90.56)
Colitis ulcerosa	57.1 (39.35-73.68)	91.3 (71.96-98.93)	95.4 (77.16-99.88)
Morbus Crohn	72.8 (61.81-82.13)	96.9 (89.16-99.62)	96.7 (89.32-9.63)

* $P < 0,5$ verglichen mit Guajak-Tests. Die Werte in Klammern bezeichnen den 95 % Vertrauensbereich (KI, Konfidenzintervall). **IFOBT**, Immunochemischer Test zum Nachweis von okkultem Blut im Stuhl; **PPW**, positiv-prädikativer Wert; **NPW**, negativ-prädikativer Wert; **ELISA**, enzyme-linked immunosorbent assay; **KI**, Konfidenzintervall (Vertrauensbereich).

Aus: Hoepffner N et al. (2006) Comparative evaluation of a new bedside faecal occult blood test in a prospective multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther* 23 (1):145-54

Aus: Hoepffner N et al. (2006) Comparative evaluation of a new bedside faecal occult blood test in a prospective multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther* 23 (1):145-54

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 beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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, zurück zu senden.

15. LITERATUR









Allgemeine Literatur

1. Lüthgens, K. et al., 1998. Hemoglobin-Haptoglobin-Complex: A Highly Sensitive Assay for the Detection of Fecal Occult Blood. *Clinical laboratory*, **44**, pp.543–551.
2. Thomas, L., 1998. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik **5th ed.**, Frankfurt/Main: *TH-Books Verlagsgesellschaft*.
3. John, M. et al., 1994. Nachweis von Albumin im Stuhl zur Erkennung okkultur Blutungen : Vergleich zweier immunologischer Tests . Radiale Immundiffusion vs BM-Test Colon Albumin. *Klinisches Labor*, **40**, pp.77–81.

Publikationen mit dem Immundiagnostik Hämoglobin-ELISA

4. Trojan, J. et al., 2002. A new immunological test strip device for the rapid, qualitative detection of faecal occult blood. *Zeitschrift für Gastroenterologie / German Journal of Gastroenterology*, **40**, pp.921–924.
5. Hoepffner, N. et al., 2006. Comparative evaluation of a new bedside faecal occult blood test in a prospective multicentre study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **23**(1), pp.145–54.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis

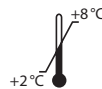
Manual

Hemoglobin ELISA Kit

For the in vitro determination of hemoglobin in stool

Valid from 2015-03-23

REF K 7816D



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	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
<i>Sample stability and storage</i>	19
<i>Extraction of the stool samples</i>	19
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	22
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Precision and reproducibility</i>	23
<i>Analytical Sensitivity</i>	23
<i>Dilution recovery</i>	24
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	25
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	26
<i>General literature</i>	26
<i>Literature using Immundiagnostik hemoglobin ELISA</i>	27

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of human **hemoglobin** in stool. For *in-vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

In contrast to other commercially available Hemoglobin quick tests, this **hemoglobin ELISA** does not require previous adherence to a diet (no raw meat etc.) and recognizes human **hemoglobin** in 100-fold lower concentrations. This avoids false-negative results. Because of the choice of antibodies, false-positive results are almost excluded.

Recent data show, that the clinical specificity and sensitivity can be increased by using Hemoglobin ELISA.

Indications

- Occult blood in stool
- Crohn´s disease; ulcerative colitis
- Suspicion of colon carcinoma
- Polyps in the colorectum

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7816D	PLATE	Holder with pre-coated strips	12 x 8
K 7816D	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 7816D	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract</i> ®, 2.5 x	1 x 100 ml
K 7816D	SAMPLEBUF	Dilution buffer, ready to use	2 x 15 ml
K 7816D	CONJ	Conjugate, (mouse-anti humanHb, peroxidase-labeled), ready to use	1 x 15 ml
K 7816D	STD	Standards, lyophilized (50; 10; 3.3; 0.67; 0 µg/g)	4 x 5 vials
K 7816D	CTRL	Controls, lyophilized	4 x 2 vials
K 7816D	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 7816D	STOP	ELISA stop solution, ready to use	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. PREPARATION AND STORAGE 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 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 in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate IDK Extract®** must be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 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 **IDK Extract®** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract®*) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for three months**.

- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (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 insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls are not stable.**
- 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

Sample stability and storage

Raw stool can be stored for **1 month** at **-20 °C**.

Stool extract is stable at room temperature (15-30 °C) for one day, at 2–8 °C as well as at -20 °C for five days. Avoid more than three freeze-thaw cycles.

Extraction of the stool samples

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, inoculation 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 (yellow part of cap) to open. Insert yellow dipstick into

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 turquoise ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

The sample suspension is now ready for use.

The sample can also be used in a pipetting automat. Place the sample in the sample rack according to instrument instructions.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is used for quantitative determination of hemoglobin in stool. The hemoglobin in the sample is bound to anti-hemoglobin antibodies (in excess), which are immobilized on the surface of the microtiter wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step an anti-hemoglobin peroxidase labeled antibody is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine. An acidic solution is then added to stop the reaction. The color converts from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of hemoglobin in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. Hemoglobin present 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.

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.

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.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash the pre-coated microtiter plate 5 x with 250 µl wash buffer before use . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be tapped on absorbent paper.
2.	Add in each well 50 µl of SAMPLEBUF (sample dilution buffer)
3.	Then 50 µl of CTRL/STD/SAMPLE (control/standard/sample) into respective well (see template given in the test kit).
4.	Incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C).
5.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
6.	Add 100 µl conjugate in each well.
7.	Incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C).
8.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
9.	Add 100 µl SUB (TMB substrate).
10.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature (15–30 °C)*
11.	Add 100 µl STOP (stop solution) and mix shortly.
12.	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.

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 calibrator 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 pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Stool

Since the sample dilution is already considered in the calibration curve, the dilution factor is **1**.

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

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) 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

Hemoglobin (stool)* $< 2 \mu\text{g/ml} \triangleq < 2 \mu\text{g/g}$
(1 g stool \triangleq 1 ml)

* H.G. Bischoff et al., 1990. Fecal Occult Blood: A Sensitive and Specific Method for Detection by Immunological Determination of Human Albumin and Hemoglobin. *Ärztl. Lab.*, **36**. pp. 101–112.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 42)

Sample	Hemoglobin [$\mu\text{g/g}$]	CV [%]
1	3.99	4.75
2	7	2.53

Inter-Assay (n = 63)

Sample	Hemoglobin [$\mu\text{g/g}$]	CV [%]
1	0.863	8.16
2	3.501	4.76

Analytical Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2 \text{SD}$. The zero-standard was measured 20 times. A detection limit of $0.042 \mu\text{g/ml}$ was obtained.

Dilution recovery

Two patient samples were diluted and analyzed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	Hämoglobin expected [µg/g]	Hämoglobin measured [µg/g]
A	-	13.83	13.83
	1:2	6.92	6.74
	1:4	3.46	3.52
	1:8	1.73	1.61
B	-	17.74	17.74
	1:2	8.87	8.78
	1:4	4.44	4.47
	1:8	2.22	1.98

Sensitivities, specificities, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of three fecal occult blood tests (FOBTs) in different diagnostic groups.

Parameters	Guajak-based test	Bedside-IFOBT	ELISA-IFOBT
Sensitivity (%)			
Adenomas	5.56 (0.14-27.29)	18.9 (3.58-41.42)	22.2* (6.41-47.64)
Carcinomas	37.0 (24.29-51.26)	74.0* (60.35-85.04)	77.7* (64.40-87.96)
Carcinomas + adenomas	29.1 (19.05-41.07)	59.7* (47.50-71.12)	63.8* (51.71-74.88)
Colitis ulcerosa	48.2 (29.45-67.47)	93.1 (77.23-99.15)	96.5 (82.24-99.9)
Morbus Crohn	42.1 (26.31-59.18)	94.7* (82.25-99.36)	94.7* (82.25-99.36)
Specifity (%)			
Carcinomas + adenomas	90.2 (84.64-94.32)	94.5 (89.84-97.46)	96.3* (92.21-98.65)
Colitis ulcerosa	90.9 (70.84-98.88)	95.4* (77.16-99.88)	95.4 (77.16-99.88)
Morbus Crohn	89.3 (79.36-95.63)	93.9* (85.20-98.32)	95.4* (87.29-99.05)
PPW (%)			
Adenomas	5.9 (0.15-28.69)	25.0 (5.49-57.19)	40.0 (12.16-73.76)
Carcinomas	55.6 (38.10-72.06)	81.6 (67.98-91.24)	87.5 (74.75-95.27)
Carcinomas + adenomas	56.7 (39.49-72.90)	82.6 (69.67-91.77)	88.4 (76.56-95.65)
Colitis ulcerosa	87.5 (61.65-98.45)	96.4 (81.65-99.91)	96.6 (82.24-99.91)
Morbus Crohn	69.6 (47.08-86.79)	90.0 (76.34-97.21)	92.3 (79.13-98.38)

Parameters	Guajak-based test	Bedside-IFOBT	ELISA-IFOBT
NPW (%)			
Adenomas	89.7 (84.02-93.88)	91.2 (85.86-94.98)	91.9 (86.72-95.48)
Carcinomas	81.3 (74.89-86.70)	91.7 (86.49-95.40)	92.9 (87.99-96.30)
Carcinomas + adenomas	74.4 (67.72-80.28)	84.2 (78.16-89.18)	85.9 (79.99-90.56)
Colitis ulcerosa	57.1 (39.35-73.68)	91.3 (71.96-98.93)	95.4 (77.16-99.88)
Morbus Crohn	72.8 (61.81-82.13)	96.9 (89.16-99.62)	96.7 (89.32-9.63)

* $P < 0.05$ compared with Guaiac-based test. Values in parentheses indicate 95% CI. **IFOBT**, immunochemical fecal occult blood tests; **PPV**, positive predictive value; **NPV**, negative predictive value; **ELISA**, enzyme-linked immunosorbent assay; **CI**, confidence interval.

From: Hoepffner N et al. (2006) Comparative evaluation of a new bedside faecal occult blood test in a prospective multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther* 23 (1):145-54

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









General literature

1. Lüthgens, K. et al., 1998. Hemoglobin-Haptoglobin-Complex: A Highly Sensitive Assay for the Detection of Fecal Occult Blood. *Clinical laboratory*, **44**, pp.543–551.
2. Thomas, L., 1998. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik **5th ed.**, Frankfurt/Main: *TH-Books Verlagsgesellschaft*.
3. John, M. et al., 1994. Nachweis von Albumin im Stuhl zur Erkennung okkulter Blutungen : Vergleich zweier immunologischer Tests . Radiale Immundiffusion vs BM-Test Colon Albumin. *Klinisches Labor*, **40**, pp.77–81.

Literature using Immundiagnostik hemoglobin ELISA

4. Trojan, J. et al., 2002. A new immunological test strip device for the rapid, qualitative detection of faecal occult blood. *Zeitschrift für Gastroenterologie / German Journal of Gastroenterology*, **40**, pp.921–924.
5. Hoepffner, N. et al., 2006. Comparative evaluation of a new bedside faecal occult blood test in a prospective multicentre study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **23**(1), pp.145–54.

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