

Hb-Hp-Komplex ELISA Kit

Zur in-vitro-Bestimmung des Hämoglobin-/Haptoglobin-Komplex in Stuhl

Hb/Hp complex ELISA Kit

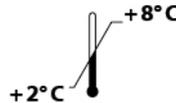
For the in vitro determination of hemoglobin/haptoglobin complex in stool

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Gültig ab / Valid from 19.05.2014

REF K 7837D



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>Stuhlprobenextraktion</i> | 4 |
| <i>Lagerung der Proben</i> | 5 |
| 7. TESTDURCHFÜHRUNG | 5 |
| <i>Testprinzip</i> | 5 |
| <i>Pipettierschema</i> | 6 |
| 8. ERGEBNISSE | 7 |
| 9. EINSCHRÄNKUNGEN | 7 |
| 10. QUALITÄTSKONTROLLE | 7 |
| <i>Referenzwerte</i> | 8 |
| 11. TESTCHARAKTERISTIKA | 8 |
| <i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i> | 8 |
| <i>Analytische Sensitivität</i> | 8 |
| 12. VORSICHTSMASSNAHMEN | 8 |
| 13. TECHNISCHE MERKMALE | 9 |
| 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 10 |
| 15. LITERATUR | 10 |
| <i>Allgemeine Literatur</i> | 10 |
| <i>Publikationen mit dem Immundiagnostik Hb-Hp-Komplex ELISA</i> | 10 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes in Stuhl. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Der Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex kann als Marker für gastrointestinale Blutungen verwendet werden. Die Untersuchung okkulten Blutes wird in den meisten Fällen zur Erkennung kolorektaler Karzinome durchgeführt. Der immunologische Test für den Nachweis des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes im Stuhl basiert auf Antikörpern, die spezifisch das humane Molekül erkennen und damit im Gegensatz zu den Schnelltests den Vorteil bieten, dass sie ernährungsunabhängige Resultate liefern.

Indikationen

- Nachweis von Blutungsquellen im unteren Gastrointestinaltrakt
- Marker für Colitis Ulcerosa bzw. Morbus Crohn
- Nachweis kolorektaler Karzinome
- Nachweis kolorektaler Polypen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|-------------|--------------|---|------------|
| K 7837D MTP | PLATE | Mikrotiterplatte, vorbeschichtet | 96 |
| K 7837D WP | WASHBUF | ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x | 2 x 100 ml |
| K 7837D EP | IDK Extract® | Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5x | 1 x 100 ml |
| K 7837D PV | SAMPLEBUF | Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig | 2 x 15 ml |
| K 7837D K | CONJ | Konjugat, (Maus-anti-human-Hb, Peroxidase-markiert), gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |
| K 7837D CAL | CAL | Kalibrator, lyophilisiert | 4 vials |
| K 7837D HC | HC | Hohe Kontrolle, lyophilisiert | 4 vials |
| K 7837D LC | LC | Niedrige Kontrolle, lyophilisiert | 4 vials |
| K 7837D TMB | SUB | TMB-Substrat (Tetramethyl- benzidin), gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |
| K 7837D AC | STOP | ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig | 1 x 15 ml |

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 4 x 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.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 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 **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®** (IDK Extract®) 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 vier Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- **CAL** (Kalibrator), **HC** (hohe Kontrolle) und **LC** (niedrige Kontrolle) werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Kalibratoren und Kontrolle können nicht gelagert werden.

Als Leerwert (BLANK) werden 50 µl SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) pipettiert.

- 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

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 (türkisfarbener 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 Samplerrack gestellt.

Lagerung der Proben

Rohtuhl 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 sieben Tage haltbar. Die Extrakte sollten maximal drei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der vorliegende ELISA dient zur quantitativen Erfassung des humanen Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes im Stuhl. Proben und Standards werden in die mit anti-Haptoglobin-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gegeben. Nach einer Inkubation werden nichtgebundene Komponenten entfernt. Das gebundene Antigen wird mittels eines Antikörper-POD/TMB-Systems nachgewiesen. Die Quantifizierung erfolgt durch Bestimmung der Extinktion bei 450 nm. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Musterkalibrierkurve lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

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.

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 HC/LC/CAL/BLANK/SAMPLE (hohe Kontrolle/niedrige Kontrolle/Kalibrator/Leerwert/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 verdünntem WASHBUF waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen. |
| 6. | 100 µl CONJ (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 verdünntem WASHBUF 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

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log-Modell unter Verwendung der Angaben zu dem Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

Abhängig von der verwendeten Software kann der Kalibrationskurvenverlauf sowohl durch die Parameter A, B, C und D als auch durch die Wertepaare aus Konzentration und optischer Dichte der Standards beschrieben werden.

Achtung: Die Parameterwerte müssen genau eingegeben werden, da selbst geringe Abweichungen der Zahlenwerte zu massiven Störungen der Auswertung führen können.

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.

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 Kon-

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

Referenzwerte

Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex-Konzentration (Stuhl)*: **< 2 µg/ml \triangleq < 2 µg/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/ Haptoglobin [µg/g] | VK [%] |
|-------|-----------------------------------|--------|
| 1 | 3,88 | 2,49 |
| 2 | 8,31 | 3,89 |

Inter-Assay (n = 30)

| Probe | Hämoglobin/ Haptoglobin [µg/g] | VK [%] |
|-------|-----------------------------------|--------|
| 1 | 1,16 | 4,29 |
| 2 | 4,2 | 2,64 |

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 0,054 µg/ml.

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, 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 okkulterer Blutungen : Vergleich zweier immunologischer Tests . Radiale Immundiffusion vs BM-Test Colon Albumin. *Klinisches Labor*, **40**, pp.77–81.

Publikationen mit dem Immundiagnostik Hb-Hp-Komplex ELISA

4. Chalkias, A. et al., 2011. Patients with colorectal cancer are characterized by increased concentration of fecal hb-hp complex, myeloperoxidase, and secretory IgA. *American journal of clinical oncology*, **34**(6), pp.561–6.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Hb/Hp complex ELISA Kit

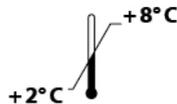
For the in vitro determination of hemoglobin/haptoglobin complex in stool

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Valid from 19.05.2014

REF K 7837D



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 | 14 |
| 2. INTRODUCTION | 14 |
| 3. MATERIAL SUPPLIED | 14 |
| 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 15 |
| 5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS | 15 |
| 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES | 16 |
| <i>Extraction of the stool samples</i> | 16 |
| <i>Sample stability and storage</i> | 17 |
| 7. ASSAY PROCEDURE | 17 |
| <i>Principle of the test</i> | 17 |
| <i>Test procedure</i> | 17 |
| 8. RESULTS | 18 |
| 9. LIMITATIONS | 19 |
| 10. QUALITY CONTROL | 19 |
| <i>Reference range</i> | 20 |
| 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 20 |
| <i>Precision and reproducibility</i> | 20 |
| <i>Analytical Sensitivity</i> | 20 |
| 12. PRECAUTIONS | 20 |
| 13. TECHNICAL HINTS | 21 |
| 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE | 21 |
| 15. REFERENCES | 22 |
| <i>General literature</i> | 22 |
| <i>Literature using Immundiagnostik Hb/Hp complex ELISA</i> | 22 |

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of hemoglobin/haptoglobin complex in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

In contrast to commercially available rapid tests, this hemoglobin/haptoglobin complex ELISA does not require previous adherence to a diet (no raw meat etc.) and recognizes human hemoglobin/haptoglobin complex in 100-fold lower concentrations. This avoids false-negative results. Because of the antibodies used, false-positive results are almost excluded. Recent data show that the hemoglobin/haptoglobin complex determination increases the clinical specificity and sensitivity.

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 7837D MTP | PLATE | Holder with pre-coated strips | 12 x 8 |
| K 7837D WP | WASHBUF | ELISA wash buffer concentrate, 10x | 2 x 100 ml |
| K 7837D EP | IDK Extract® | Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract®</i> , 2.5 x | 1 x 100 ml |
| K 7837D PV | SAMPLEBUF | Dilution buffer, ready to use | 2 x 15 ml |
| K 7837D K | CONJ | Conjugate, (mouse anti-human Hb, peroxidase-labeled), ready to use | 1 x 15 ml |
| K 7837D CAL | CAL | Calibrator, lyophil. | 4 vials |
| K 7837D HC | HC | High Control, lyophil. | 4 vials |
| K 7837D LC | LC | Low Control, lyophil. | 4 vials |
| K 7837D TMB | SUB | TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use | 1 x 15 ml |
| K 7837D AC | STOP | ELISA stop solution, ready to use | 1 x 15 ml |

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.
- 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 *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*® extraction buffer concentrate** 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 four months**.
- The lyophilized **HC** (high control), **LC** (low control) and **CAL** (calibrator), 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 control are not stable.**

Please dispense 50 µl of SAMPLEBUF (sample dilution buffer) as BLANK into the respective well.

- 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

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.

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 seven days. Avoid more than three freeze-thaw cycles.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is used for quantitative determination of hemoglobin/haptoglobin complex in stool. The hemoglobin/haptoglobin complex in the sample is bound to anti-haptoglobin 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 (TMB). 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 the complex in the sample. Hemoglobin/haptoglobin complex, present in the patient samples, is quantified by referring the optical density of patient's samples to a lot-dependant master calibration curve. This is done by using a reference/calibrator that is run with each test.

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.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

| | |
|-----|---|
| 1. | Wash the pre-coated microtiter plate 5 x with 250 µl ELISA 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 HC/LC/CAL/BLANK/SAMPLE (high control/low control/calibrator/blank/sample) into respective well (see template given in the test kit). |
| 4. | Incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C). |
| 5. | Decant the content of the plate and wash the wells 5 x with 250 µl diluted WASHBUF. |
| 6. | Add 100 µl of CONJ (peroxidase-labeled antibody). |
| 7. | Incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C). |
| 8. | Decant the content of the plate and wash the wells 5 x with 250 µl diluted WASHBUF. |
| 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

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the standard curve of the respective kit lot and the Calibrator value (CAL). All essential information on the standard curve is provided on the QC data sheet of the respective product lot.

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A, B, C and D. In both cases the optical density of the calibrator (CAL) is essential.

Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

Caution: Please make sure that all parameters and values are transferred accurately into your software as minor deviations can cause severe errors during evaluation.

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.

Stool

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

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater 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/haptoglobin complex (stool)*: **< 2 µg/ml \triangleq < 2 µg/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. *Arztl. 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/ haptoglobin [µg/g] | CV [%] |
|--------|-----------------------------------|--------|
| 1 | 3.88 | 2.49 |
| 2 | 8.31 | 3.89 |

Inter-Assay (n = 63)

| Sample | Hemoglobin/ haptoglobin [µg/g] | CV [%] |
|--------|-----------------------------------|--------|
| 1 | 1.16 | 4.29 |
| 2 | 4.2 | 2.64 |

Analytical Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$. The zero-standard was measured 20 times. A detection limit of 0.054 µg/ml was obtained.

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 okkultur Blutungen : Vergleich zweier immunologischer Tests . Radiale Immundiffusion vs BM-Test Colon Albumin. *Klinisches Labor*, **40**, pp.77–81.

Literature using Immundiagnostik Hb/Hp complex ELISA

4. Chalkias, A. et al., 2011. Patients with colorectal cancer are characterized by increased concentration of fecal hb-hp complex, myeloperoxidase, and secretory IgA. *American journal of clinical oncology*, **34**(6), pp.561–6.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number