

Hämoglobin ELISA

Zur in vitro Bestimmung des Hämoglobin in Stuhl

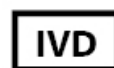
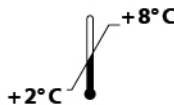
Hemoglobin ELISA Kit

For the in vitro determination of Hemoglobin in stool

Gültig ab / Valid from 14.01.2009



K 7816A



Immundiagnostik AG

Inhalt

Content.....	16
1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	2
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
8. PROBENVORBEREITUNG	5
Stuhlprobenextraktion	5
Probenverdünnung	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	8
Hinweise	8
Pipettierschema	8
10. ERGEBNISSE	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	10
12. QUALITÄTSKONTROLLE	10
Erwartete Ergebnisse	10
13. TESTCHARAKTERISTIKA	10
Sensitivität und Spezifität	10
14. LITERATUR	12
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	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. TESTPRINZIP

Der vorliegende Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (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 werden 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. Anhand einer mitgeführten Eichkurve lässt sich die Konzentration des Hämoglobins der Proben ermitteln.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K 7816A MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 7816A WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 7816A EP	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat 2.5 x	2 x 100 ml
K 7816A PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 7816A K	CONJ	Konjugat, (Maus anti human Hb, Peroxidase-markiert)	1 x 200 µl
K 7816A ST	STD	Standards, lyophilisiert (40; 13.3; 4.5; 1.5; 0 ng/ml)	5 vials
K 7816A KO	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	1 vial
K 7816A TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7816A AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Auf Wunsch erhalten Sie bei Bedarf 3 weitere Standardsets kostenlos. Jedes weitere Standardset wird berechnet.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10-1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. 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 als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), 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 **WASHBUF** (Pufferkonzentrat) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Das **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:2,5** mit bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (90 ml Konzentrat + 135 ml aqua bidest.). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C vier Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrolle) werden mit **500 µl aqua bidest.** rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrolle können nicht gelagert werden.
- Das **CONJ** (Konjugat) (POD-markierter Antikörper) wird **1:100 in SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml SAMPLEBUF). Unverdünntes Konjugat 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.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur In-vitro-Diagnostik.
- Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muß auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muß die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlprobenextraktion

Der verdünnte Extraktionspuffer wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

1. Es wird ein Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 745 804)) verwendet, das 100 mg dosiert. In diesem Stuhlaufarbeitungssystem wird die **Stuhlprobe in 5 ml [EXBUF] Extraktionspuffer** suspendiert.

Puffervolumen konstant: 5 ml

Verdünnungsfaktor konstant: 1:50

Alternativ kann eine Stuhlprobe im Bereich von **80 - 120 mg** eingewogen werden.

Exakte Menge von jeder Probe notieren!

- a. Jede einzelne Probe wird in 5 ml Puffer unabhängig von der eingewogenen Menge suspendiert.

Puffervolumen konstant: 5 ml

Der Verdünnungsfaktor ändert sich entsprechend der Einwaage. Er kann der folgenden Tabelle entnommen werden und muss bei der Auswertung berücksichtigt werden:

Einwaage [mg]	Verdünnungsfaktor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
100	50

Einwaage [mg]	Verdünnungsfaktor
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

- b. Die **Puffermengen** für die einzelnen Proben variieren in Abhängigkeit von den Stuhleinwaagen (siehe Tabelle). Dabei bleibt der Verdünnungsfaktor konstant.

Puffervolumen variabel

Verdünnungsfaktor konstant: 1:50

Somit kann der Verdünnungsfaktor für die Auswertung aller Proben einheitlich verwendet werden.

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
100	5.0

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
120	6.0

Anschließend wird die Stuhlprobe mit dem Puffer gut gemischt (z. B. Vortexer für mindestens 30 sec. je nach Stuhlkonsistenz).

Danach wird ca. **1 ml von der Suspension (Verdünnung I)** in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und für 5 Minuten bei 13000 g zentrifugiert.

Probenverdünnung

Stuhlproben

Der Überstand nach der Zentrifugation (Verdünnung I) wird **1 : 20 mit Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF)** verdünnt. Zum Beispiel:

50 µl Überstand (Verdünnung I) + 950 µl SAMPLEBUF = 1 : 20 (**Verdünnung II**)

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

Die Stuhlsuspension ist nicht haltbar. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen. Stuhlproben können bei -20°C 4 Wochen gelagert werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Endverdünnung: 1 : 1000

2. Immundiagnostik bietet ein alternatives Probengewinnungs und –aufbereitungssystem für Messungen im Stuhl an (Artikel Nr. K 6998 SAS).

Kurzbeschreibung zur Anwendung der Stuhlröhrchen:

Unteres Röhrchengewinde aufschrauben, 2ml Extraktionspuffer in das Röhrchen pipetieren, zuschrauben.

Oberes Röhrchengewinde aufschrauben.

Unteren Teil des Stäbchens mit Einkerbungen in die Stuhlprobe stechen und ins Röhrchen zurückführen. Gut mischen.

Unteren Schraubverschluss aufschrauben, 0,5 - 1 ml Suspension abnehmen, in ein Eppendorf-Gefäß überführen und für 5 Minuten bei 13000 g zentrifugieren. Alternativ besteht die Möglichkeit die Proben in den Originalröhrchen zu zentrifugieren.

Den Überstand mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) aus dem Kit **1 : 10** weiter verdünnen,

z.B.: 50 µl Überstand + 450 µl SAMPLEBUF

Endverdünnung: 1 : 1000

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Nur zur In-vitro-Diagnostik.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. 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 verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

Pipettierschema

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch **5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF** waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

Wenn über eine Hausinterne Evaluierung sichergestellt ist, dass die Präzision den im Haus vorgegebenen Qualitätskriterien entspricht, kann das Anwenderlabor auf eigene Verantwortung die Analysen in Einfachwerten durchführen.

1.	100 µl STD/CTRL/SAMPLE (Standard/Kontrolle/Probe in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren).
2.	1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

4.	100 µl vorverdünntes CONJ (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
5.	1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7.	100 µl SUB (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren.
8.	10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren bis ausreichend große Farbdifferenzen auftreten.
9.	50 µl STOP (Stopplösung) in jede Vertiefung pipettieren.
10.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (oder 690 nm) messen.

10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

Stuhlproben:

Die ermittelte Hämoglobin Konzentration der Stuhlprobe wird wie im folgenden Beispiel berechnet:

Einwaage: 80 mg (1ml Stuhl = 1g) = 0,08 ml
 Verdünnungsstufe 1: 5ml / 0,08ml = 62,5
 Verdünnungsstufe 2: 16
 Verdünnungsfaktor: 62,5 x 16 = 1000

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **1000** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.** 9

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Hämoglobin Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Probenverdünnungspuffer stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen die Kontrollen oder Serum/Stuhl Pools, bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Proben nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

Hämoglobin-Konzentration (Stuhl): < 2 µg/ml

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Sensitivität und Spezifität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20 mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0.447 µg/ml.

Probe	Mittelwert [OD]	SD	Nachweisgrenze [µg/ml]
1	0.008	0.002	0.447

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< 0.05 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

14. LITERATUR

- Lüthgens, K. et al. (1998) Clin. Lab. 44:543-551
Thomas, L. 5. Auflage 5, Labor und Diagnose
Schmidt-Gayk, H. et al. (1994) Klin. Lab. 40:77-81

Publikationen zum Immundiagnostik Hämoglobin-ELISA:

- Trojan J et al. (2002) Z Gastroenterol 40(11):921-24
Hoepffner N et al. (2006) Aliment Pharmacol Ther 23:145-54

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur in vitro Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. 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 verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Bestandteile verschiedener Packungen nicht untereinander austauschen.
- Reagenzien nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipetervolumina 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.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

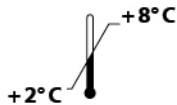
Hemoglobin ELISA Kit

For the in vitro determination of Hemoglobin in stool

Valid from 14.01.2009

REF

K 7816A



IVD



Immundiagnostik AG

Content

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. PRINCIPLE OF THE TEST	17
4. MATERIAL SUPPLIED	18
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
7. PRECAUTIONS	20
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	20
Extraction of the stool sample	20
Dilution of samples	22
9. ASSAY PROCEDURE	23
Procedural notes	23
10. RESULTS	24
11. LIMITATIONS	24
12. QUALITY CONTROL	25
Expected values	25
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
Sensitivity and Specificity	25
14. LITERATURE	27
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27

1. INTENDED USE

The 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. PRINCIPLE OF THE TEST

The Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (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 (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 Hemoglobin 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. Hemoglobin, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Label	Kit Components	Quantity
K 7816A MTP	PLATE	One holder with pre-coated strips	12 x 8
K 7816A WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate (10x)	2 x 100 ml
K 7816A EP	EXBUF	Extraction buffer concentrate 2.5 x	2 x 100 ml
K 7816A PV	SAMPLEBUF	Dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 7816A K	CONJ	Conjugate, (mouse-anti humanHb, peroxidase-labeled)	1 x 200 µl
K 7816A ST	STD	Calibrators, lyophil. (40; 13.3; 4.5; 1.5; 0 ng/ml)	5 vials
K 7816A KO	CTRL	Control, lyophil.	1 vial
K 7816A TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 7816A AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

On request, we will send you 3 calibrator sets free of charge. Any further calibrator sets will be charged.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** 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 **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C before dilution. The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) is **stable at 2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at 2-8°C for one month.
- The **EXBUF** (extraction buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:2.5** before use (90 ml concentrate + 135 ml aqua bidest.). Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved in a water bath at 37°C before dilution. The **EXBUF** (extraction buffer concentrate) is **stable at 2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at 2-8°C for fore months.
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (control) must be reconstituted with **500 µl aqua bidest.** 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.**
- The **CONJ** (conjugate) (POD-antibody) must be diluted **1:100** in **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) (100 µl **CONJ** + 10 ml **SAMPLEBUF**). The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not 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**.

7. PRECAUTIONS

- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Extraction of the stool sample

Diluted extraction buffer is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

1. We recommend the use of a stool sample preparation kit for dosing 100 mg of stool sample (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; cat # 745804). The stool sample must be suspended in **5 ml extraction buffer**.
Constant buffer volume: 5 ml
Constant dilution factor: 1:50

Alternatively, stool samples can be manually weighted within the range of **80 – 120 mg**. Please note the exact sample amount!

- a. Add **5 ml buffer** to the stool sample not depending on the sample amount.
Constant buffer volume: 5 ml

The dilution factor varies depending on the sample amount which must be considered in the subsequent calculations as shown below:

Weight [mg]	Dilution factor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
100	50

Weight [mg]	Dilution factor
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

- b. The buffer volume for the individual samples varies depending on the sample amount (see table). The dilution factor remains constant.

Variable buffer volume

Constant dilution factor: 1:50

Therefore, the same dilution factor can be used for all samples in the subsequent evaluation of the results.

Weight [mg]	Buffer volume [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
100	5.0

Weight [mg]	Buffer volume [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
120	6.0

- Afterwards, mix stool sample and buffer; vortex for at least 30 sec. depending on the stool consistency.
- Transfer approx. 1 ml stool suspension (dilution step I) to an Eppendorf-tube and centrifuge for 5 minutes at 13000 g.

Dilution of samples

Stool samples

- The supernatant of the centrifugation (dilution step I) is diluted **1:20 in sample dilution buffer** (SAMPLEBUF). For example:
50 µl supernatant of dilution I + 950 µl SAMPLEBUF = 1:20 (**dilution step II**)
- For analysis, pipette **100 µl of dilution step II** per well.
- **The supernatant is not stable and can not be stored.** We recommend to weight fresh sample amount for a new assay, if the analysis should be repeated.
- Stool samples can be stored at -20°C for 4 weeks. Avoid thawing and freezing cycles.

Final dilution: 1 : 1000

2. Immundiagnostik offers an alternative sample extraction and preparation system for measurements of stool samples (Catalogue Nr. K 6998 SAS).

Short description of the use of the stool tubes:

Unscrew the lower cap of the sample collection system, pipette 2ml of extraction buffer in the tube and screw tightly.

Unscrew the upper cap of the sample collection device.

Insert the tip of the notched collection stick into the faeces. Put the sample collection stick with the adhering faecal sample back into the sample collection device and screw tightly. Shake it very well.

Then, unscrew the lower cap of the sample collection device, transfer 0.5 - 1 ml of the suspension in an Eppendorf cup and centrifuge for 5 min at 13000 g. Alternatively, the samples can be centrifuged in the stool collection tubes.

Dilute the supernatant **1 : 10** with the SAMPLEBUF (sample dilution buffer) from the Kit, e.g.: 50 µl supernatant + 450 µl SAMPLEBUF

Final dilution: 1 : 1000

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components have been defined by the producer. Any variations of the test procedure, without consulting the producer, may influence the test results. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Wash the precoated microtiter plate 5 x with 250 µl diluted WASHBUF. Carry out the tests in duplicate. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.

The user can perform single analyses on his own responsibility, if the precision of the own internal measurements meets the in-house quality requirements.

1.	Add 100 µl STD/CTRL/SAMPLE (Standards/Control/Sample) into respective well.
2.	Incubate for 1 hour , shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
3.	Decant the content of the plate and wash the wells 5 x with 250 µl diluted WASHBUF.
4.	Add 100 µl pre-diluted CONJ (Peroxidase-labeled antibody).
5.	Incubate for 1 hour , shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
6.	Decant the content of the plate and wash the wells 5 x with 250 µl diluted WASHBUF.
7.	Add 100 µl SUB (TMB substrate).

8.	Incubate for 10-20 minutes at room temperature.
9.	Add 50 µl STOP (stop solution) and mix shortly.
10.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference.

10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the standards. For data evaluation, commercially available software can be used as well as graph paper. Results of the samples are read from this calibration curve.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a spline- or 4PL- algorithm is recommended.

Faeces

For the Hemoglobin concentration of faeces samples, calculate as described in the following example:

weight: 80 mg (1ml stool = 1g) = 0,08 ml
 dilution step 1: 5ml / 0,08 ml = 62,5
 dilution step 2: 16
 dilution factor: 62,5 x 16 = 1000

Multiply the result with **1000** to get the real concentration. **The dilution factor is dependent on the weight of the faeces.**

11. LIMITATIONS

Samples with Hemoglobin levels greater than the highest calibrator, should be further diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercial control samples for internal quality control. Control samples should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

Expected values

Normal ranges

Haemoglobin (stool) < 2 µg/ml

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity and Specificity

The sensitivity was set as $B_0 + 2SD$. The zero-standard was measured 20 times. A detection limit of 0.447 µg/ml was obtained.

Sample	Mean Value [OD]	SD	Detection limit [µg/ml]
1	0.008	0.002	0.447

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 (%)			
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)
Specifity (%)			
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 (89.32-96.63)

*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

14. LITERATURE

Lüthgens, K. et al. (1998) Clin. Lab. 44:543-551
Thomas, L. 5. Auflage 5, Labor und Diagnose
Schmidt-Gayk, H. et al. (1994) Klin. Lab. 40:77-81








Publications based on Immundiagnostik´s haemoglobin ELISA:

Trojan J et al. (2002) Z Gastroenterol 40(11):921-24
Hoepffner N et al. (2006) Aliment Pharmacol Ther 23:145-54

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- For in vitro diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be followed.
- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of 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.

Used symbols:

	Temperatur limitation		Catalogue number
	In-Vitro-Diagnostic Medical Device		Contains sufficient for <n> tests
	Manufacturer		Use by
	Lot number		



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49(0) 62 51/70 19 00

Fax: +49(0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com