

Arbeitsanleitung/Manual

Vorläufig / Preliminary

Super sensitive

Präalbumin/Transthyretin ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung von Präalbumin/Transthyretin in
Serum, Urin und Stuhl*

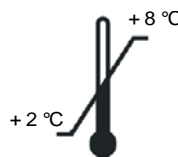
Prealbumin/Transthyretin ELISA Kit

*For the in vitro determination of prealbumin/transthyretin in
serum, urine and stool*

Gültig ab / Valid from 17.12.2007



K 6331



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

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of contents	2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
HINWEISE	7
PIPETTIERSCHEMA	8
10. ERGEBNISSE	9
MUSTEREICHKURVE	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	10
12. QUALITÄTSKONTROLLE	10
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
13. TESTCHARAKTERISTIKA	10
14. LITERATUR	11
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11

Table of contents	Page
1. INTENDED USE	14
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	14
4. MATERIAL SUPPLIED	15
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
7. PRECAUTIONS	17
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
9. ASSAY PROCEDURE	18
PROCEDURAL NOTES	18
TEST PROCEDURE	19
10. RESULTS	20
TYPICAL CALIBRATION CURVE	20
11. LIMITATIONS	21
12. QUALITY CONTROL	21
EXPECTED VALUES	21
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
14. REFERENCES	22
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	22

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) Kit ist für die quantitative Bestimmung von **Präalbumin (Transthyretin)** in Serum, Urin und Stuhl geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

folgt

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik mit zwei ausgewählten Antikörpern, die humanes **Präalbumin (Transthyretin)** erkennen.

Das humane Pre-Albumin aus den Proben wird in einem einstündigen Inkubationsschritt an die auf der Mikrotiterplatte immobilisierten polyklonalen Antikörper gegen Präalbumin gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen humanen Präalbumins erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines Peroxidase-markierten Antikörpers, der sich ebenfalls an das humane Präalbumin bindet. Als Substrat für die Peroxidase wird Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Die Substratumsetzung ist direkt proportional zum gebundenen human Albumin und kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

Standards, Kontrollen und Proben, die **Präalbumin (Transthyretin)** enthalten, werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, deren Vertiefungen mit polyklonalen anti-human Präalbumin (Transthyretin) Antikörpern beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das Präalbumin (Transthyretin) aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Es folgt die Zugabe vom Konjugat (ein Peroxidase markierter Antikörper) und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes Präalbumin (Transthyretin) - Peroxidase Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Präalbumin (Transthyretin)-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 6331MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6331WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6331K	CONJ	Konjugat, (Kaninchen anti Präalbumin, Peroxidase-markiert)	1 x 50 µl
K 6331VP	CONJBUF	Konjugat-Verdünnungspuffer	1 x 15 ml
K 6331ST	STD	Standards, lyophilisiert (0; 1.6; 6.25; 25; 100 ng/ml)	4 x 5 vials
K 6331KO	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 6331TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6331AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5 - 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 oder 405 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf achten, 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 zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnen (100 ml WASHBUF + 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** (Waschpufferkonzentrat) 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.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrolle) werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Die lyophilisierten **Standards** (STD) und **CTRL** (Kontrolle) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Rekonstituierte Standards und Kontrolle können nicht gelagert werden.
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:500** in **CONJBUF** (Konjugat-Verdünnungspuffer) verdünnt (20 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Unverdünntes **CONJ** (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.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- 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 zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal 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 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.

8. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlproben

Ca. **100 mg** Stuhl einwiegen, die genau eingewogene Stuhlmenge notieren, in **5 ml** Waschpuffer lösen und sehr gut mischen.

Probensuspension für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugieren.

1 ml Überstand abnehmen, in ein Eppendorfröhrchen überführen und bei 13000 rpm für 5 Minuten zentrifugieren.

Den Überstand **1:40** mit Waschpuffer verdünnen (z.B. 25 µl Überstand + 975 µl Waschpuffer). Von dieser Lösung werden dann **100 µl** pro Vertiefung in den Test eingesetzt.

Wir empfehlen den Stuhl für jede Messung frisch einzuwiegen. Stuhlsuspensionen können nicht gelagert werden.

Stuhlproben können bei $-20^{\circ}C$ 4 Wochen gelagert werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Zur einfacheren Dosierung und Homogenisierung des Probenmaterials empfehlen wir das Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/-Mannheim (Best. Nr. 745804).

Anmerkung: Wir empfehlen die optimale Probenverdünnung (1:500 - 1:5.000) im Voraus zu ermitteln.

Serum

Frisch abgenommenes Blut sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Es kann entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test sollten die Proben gut gemischt werden. Wir empfehlen alle Proben in Doppelbestimmungen zu analysieren.

Serumproben werden bei Normalpatienten **1:20.000** vorverdünnt im Assay eingesetzt.

1:20.000 Verdünnung

Die Verdünnung kann in drei Schritten durchgeführt werden. Zum Beispiel:

1. 50 μl Serum + 950 μl Waschpuffer, mischen;
2. aus der 1. Verdünnung
100 μl + 900 μl Waschpuffer, mischen;
3. aus der 2. Verdünnung wiederum
10 μl + 990 μl Waschpuffer, mischen (**1: 20.000**)

100 μl der letzten **Verdünnung** werden im Test eingesetzt.

Anmerkung: Wir empfehlen die optimale Probenverdünnung (1:10.000 - 1:30.000) im Voraus zu ermitteln.

Zur Berechnung der Konzentration muss der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Reagenzien nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen während den Inkubationen mit Folie abdecken.

- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien vermeiden.
- Die Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.

Pipettierschema

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

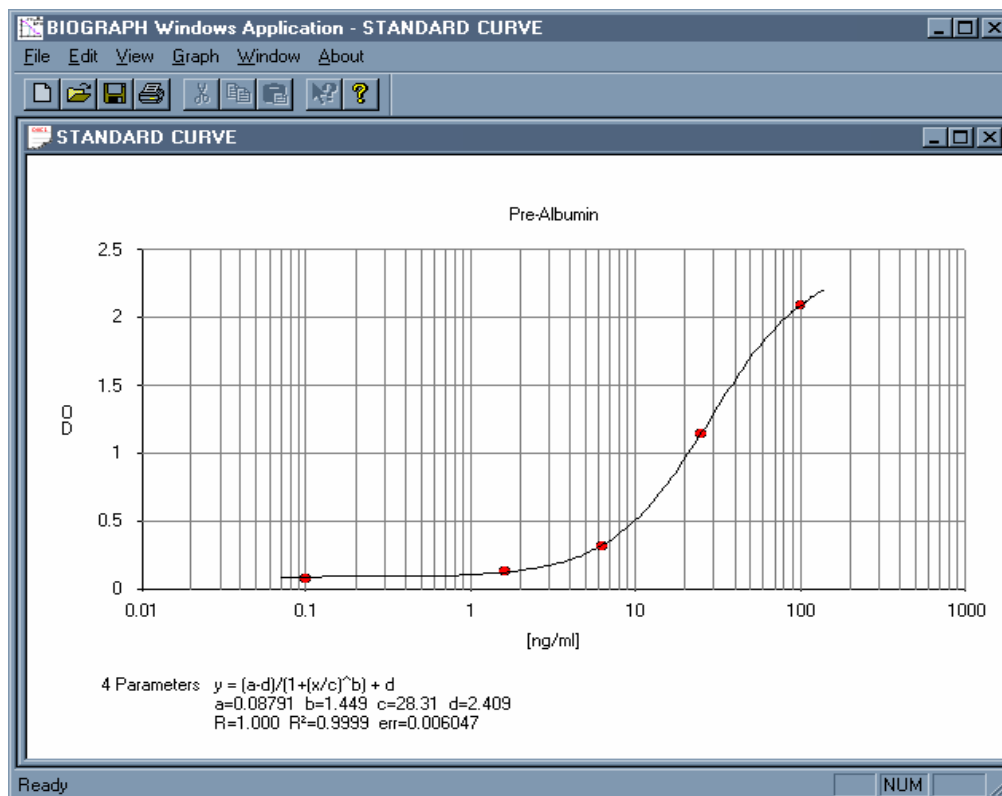
Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl STD** (Standard), **CTRL** (Kontrolle) und Patientenproben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Den Inhalt der PLATE verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. PLATE 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 PLATE verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. PLATE nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100 µl SUB** (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren.
8. **5-15 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.

Mustereichkurve



Konzentration [ng/ml]	100	25	6.25	1.6	0
OD Mittelwert	2.088	1.145	0.318	0.134	0.081

Diese Daten sind als Beispiel für eine Standardkurve aufgeführt und dürfen nicht zur Auswertung von Kundenergebnissen verwendet werden.

Stuhlproben:

Die ermittelte Präalbumin 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: 40

Verdünnungsfaktor: 2500

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **2500** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.**

Serumproben:

Die ermittelte Präalbumin-Konzentration wird mit **20.000** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen Präalbumin-Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit Waschpuffer weiter verdünnt und nochmals analysiert.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

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

Erwartete Ergebnisse

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

folgt

14. LITERATUR

1. Schmidt P N, et al. (1995) Scand J Lab Invest 55:35-45

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humansenen verwendet wurde, sind diese 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 Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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 zurück zu senden.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual
Preliminary

Super sensitive

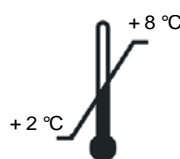
Prealbumin/Transthyretin ELISA Kit

*For the in vitro determination of prealbumin/transthyretin in
serum, urine and stool*

Gültig ab / Valid from 17.12.2007



K 6331



1. INTENDED USE

The Prealbumin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit is intended for the quantitative determination of **prealbumin (transthyretin)** in serum, urine and stool. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

soon available

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is a two step assay for the ultrasensitive determination of human **prealbumin (transthyretin)** in serum, urine and stool.

Standards, controls and samples containing human **prealbumin (transthyretin)** are added to the wells of a microplate coated with polyclonal anti-human prealbumin antibodies. The antibodies immobilized on the walls of the microtiter wells capture prealbumin in the patient samples during the first incubation step. After washing away the unbound components, a detection peroxidase-conjugated anti-prealbumin antibody is added to each well. During a second incubation, the detection antibody is bound to the captured prealbumin. A "sandwich" of capture antibody - human prealbumin - peroxidase conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The intensity of the yellow color is directly proportional to the prealbumin concentration of the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. Prealbumin present in the patient samples is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Label	Kit Components	Quantity
K 6331MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6331WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate (10x)	2 x 100 ml
K 6331K	CONJ	Conjugate, (rabbit-anti-prealbumin peroxidase-labeled)	1 x 50 μ l
K 6331VP	CONJBUF	Conjugate dilution buffer	1 x 15 ml
K 6331ST	STD	Calibrators, lyophilized (0; 1.6; 6.25; 25; 100 ng/ml)	4 x 5 vials
K 6331KO	CTRL	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K 6331TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 6331AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled (aqua bidest.) and sterile water
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 5-1000 μ l
- 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 (50 ml WASHBUF + 450 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution of the buffer solutions. 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 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. The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (control) are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Reconstituted standards and control are not stable.
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1: 500** in conjugate dilution buffer (CONJBUF) (20 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The undiluted **CONJ** (conjugate) is stable at **2-8 °C** until 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.
- Quality control guidelines should be observed.
- 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.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Faeces

Add about **100 mg** of the sample (note the sample weight for the calculation) to **5 ml** of wash buffer and mix.

Centrifuge the sample suspension for 10 min at 3000 rpm.

Transfer 1 ml of the supernatant into an Eppendorf tube and centrifuge once more at 13.000 rpm for 5 min.

Dilute supernatant **1:40** in wash buffer (25 µl supernatant + 975 µl wash buffer). Use **100 µl** of the solution for the experiment.

We recommend to weight fresh stool samples for each run. Supernatant is not stable and can't be stored.

Stool samples can be stored at -20°C for 4 weeks. Avoid repeated freezing and thawing.

Immundiagnostik recommends the use of tubes from Roche Diagnostics/Mannheim (No. 745804) for sample preparation.

Note: We recommend the determination of the optimal sample dilution (1:500 – 1:5.000) in a preliminary experiment.

Serum samples

Fresh collected blood should be centrifuged within one hour. Store samples at -20 °C if not assayed on the same day. Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicate analyses for each sample.

Normal samples are diluted **1:20,000**.

1:20,000 dilution

The dilution can be performed in three steps. For example:

1. 50 µl serum + 950 µl wash buffer, mix well;
2. of the 1. dilution
100 µl + 900 µl wash buffer, mix well;
3. of the 2. dilution
10 µl + 990 µl wash buffer, mix well (dilution **1:20,000**)

For analysis, pipette in each well **100 µl** of the **final dilution step**.

Note: We recommend the determination of the optimal sample dilution (1:10,000 – 1:30,000) in a preliminary experiment.

Use the corresponding dilution factor to calculate the concentration.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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.
- Substrate solution should remain colorless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Wash the precoated PLATE (microtiter plate) **5 x with 250 µl diluted wash buffer**. After the final washing step, the inverted PLATE should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.

Carry out the tests in duplicate.

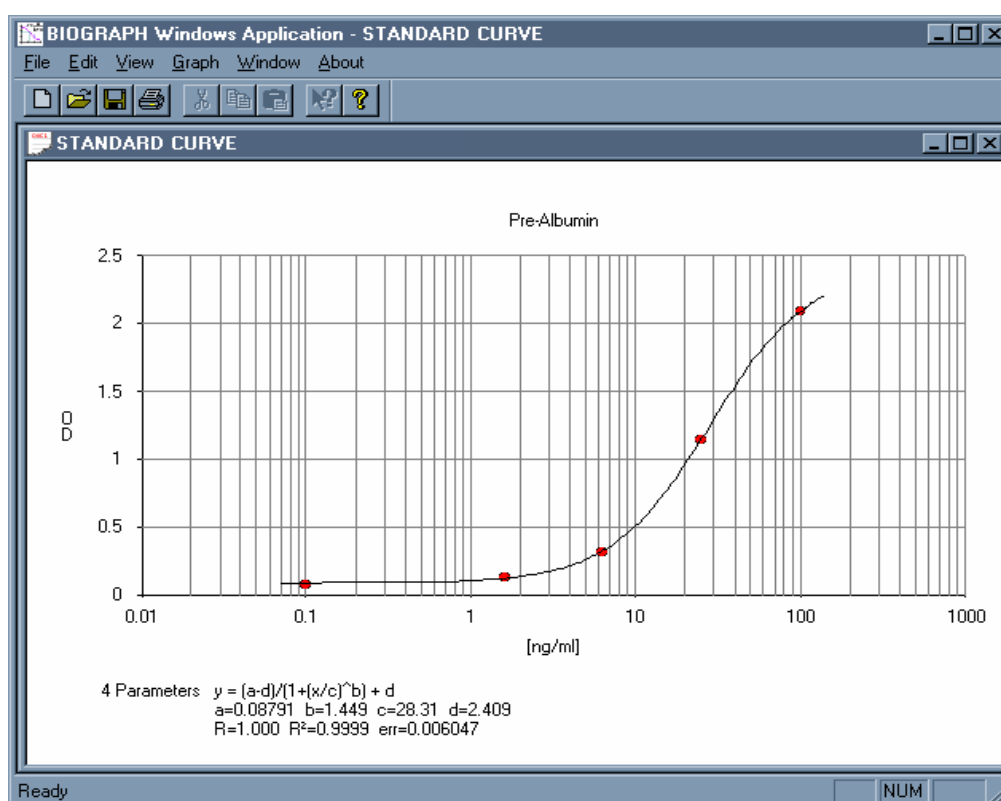
1. Add **100 µl STD** (Standard), **CTRL** (Control) and pre-diluted sample into respective well.
2. Incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature.
3. Decant the content of the PLATE and wash the wells **5 x with 250µl** diluted wash buffer.
4. Add **100 µl** pre-diluted **CONJ** (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 250µl** diluted wash buffer.
7. Add **100 µl SUB** (TMB substrate).
8. Incubate for **5-15 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. 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-algorithm is recommended.

Typical calibration curve



Concentration [ng/ml]	100	25	6.25	1.6	0
OD mean values	2.088	1.145	0.318	0.134	0.081

The data is for demonstration only and cannot be used for the evaluation of test results.

Faeces

To determine the prealbumin concentration of faecal samples, calculate as described in the following example:

Weight: 80 mg (1ml stool = 1g) = 0,08 ml

Dilution step 1: 5ml / 0,08ml = 62,5

Dilution step 2: 40

Dilution factor: 2500

Multiply the result by **2500** to get the real concentration. The dilution factor depends on the weight of the faeces.

Serum samples

For the calculation of the prealbumin concentration in **serum** the result must be multiplied by **20,000**.

11. LIMITATIONS

Samples with prealbumin levels greater than the highest standard value 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. 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.

Expected values

Each laboratory should evaluate its own baseline value.¹

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

soon available

14. REFERENCES

1. Schmidt P N, et al. (1995) Scand J Lab Invest 55:35-45

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.
- The test components which are made of human serum are tested for HVB and HIV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent; these reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. The normal precautions for laboratory working should be observed.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for in-vitro diagnostics only.
- The reagents should not be used after the date of expiry (see label on the test package).
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components have been defined by the producer. Any alterations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number