

Arbeitsanleitung/Manual

Albumin ELISA Kit

Super sensitiv

Zur in vitro Bestimmung des Albumin in Urin und Stuhl

Albumin ELISA Kit

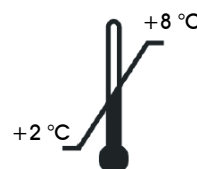
Super sensitive

For the in vitro determination of Albumin in urine and stool

Gültig ab / Valid from 06.04.2010



K 6330



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 content	2
ALBUMIN ELISA KIT	1
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	11
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	11
SENSITIVITÄT	11
KREUZREAKTIVITÄT	11
14. LITERATUR	11
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

Table of content	Page
1. INTENDED USE	15
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	18
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	18
9. ASSAY PROCEDURE	19
PROCEDURAL NOTES	19
TEST PROCEDURE	19
10. RESULTS	20
TYPICAL CALIBRATION CURVE	20
11. LIMITATIONS	21
12. QUALITY CONTROL	21
EXPECTED VALUES	21
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	22
SENSITIVITY	22
14. REFERENCES	22
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

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

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

Indikation

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

3. TESTPRINZIP

Der vorliegende Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Erfassung des humanen Albumins (h Albumin) aus Urin und Stuhl.

Das humane Albumin aus den Proben wird in einem einstündigen Inkubationsschritt an die auf der Mikrotiterplatte immobilisierten polyklonalen anti-human Albumin Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen humanen Albumins erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines Peroxidase-markierten Antikörpers, der sich ebenfalls an das humane Albumin 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.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6330MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 6330WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 6330PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K6330VP	CONJBUF	Konjugat Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6330K	CONJ	Konjugat, (Kaninchen anti Albumin, Peroxidase-markiert)	1 x 50 µl
K 6330ST	STD	Standards, lyophilisiert (0; 12.5; 50; 200; 800 ng/ml)	4 x 5 vials
K 6330KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 6330KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 6330TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6330AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch 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 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in aqua bidest. verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei 37° C im Wasserbad auf. Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C 1 Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. **Die rekonstituierten Standards und Kontrollen sind nicht stabil.**
- Das **CONJ** (Konjugat, POD-markierter AK) wird **1:400** in **CONJBUF** (Konjugatpuffer) verdünnt (z.B. 25 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). Das **CONJ** (Konjugat) ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Die verdünnte Konjugatlösung 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 befunden 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

Urin

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

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

Stuhlproben

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

Anschließend die Suspension für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugieren.

Danach den Überstand **1:5** mit **SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) weiter verdünnen (z.B. 200 µl Überstand + 800 µl SAMPLEBUF).

Aus diesen Einzelverdünnungen resultiert eine Endverdünnung von **1:250**. Von dieser Endverdünnung **100 µl** pro Vertiefung in den Test einsetzen. Wir empfehlen den Stuhl für jede Messung frisch einzuwiegen. Stuhlsuspensionen können nicht gelagert werden.

Stuhlproben können bei –20°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).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- 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.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

Pipettierschema

Die **PLATE** (vorbeschichtete Mikrotiterplatte) vor Gebrauch **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen um die Waschpufferreste vollständig zu entfernen. Dies gilt für alle folgenden Waschschrirte.

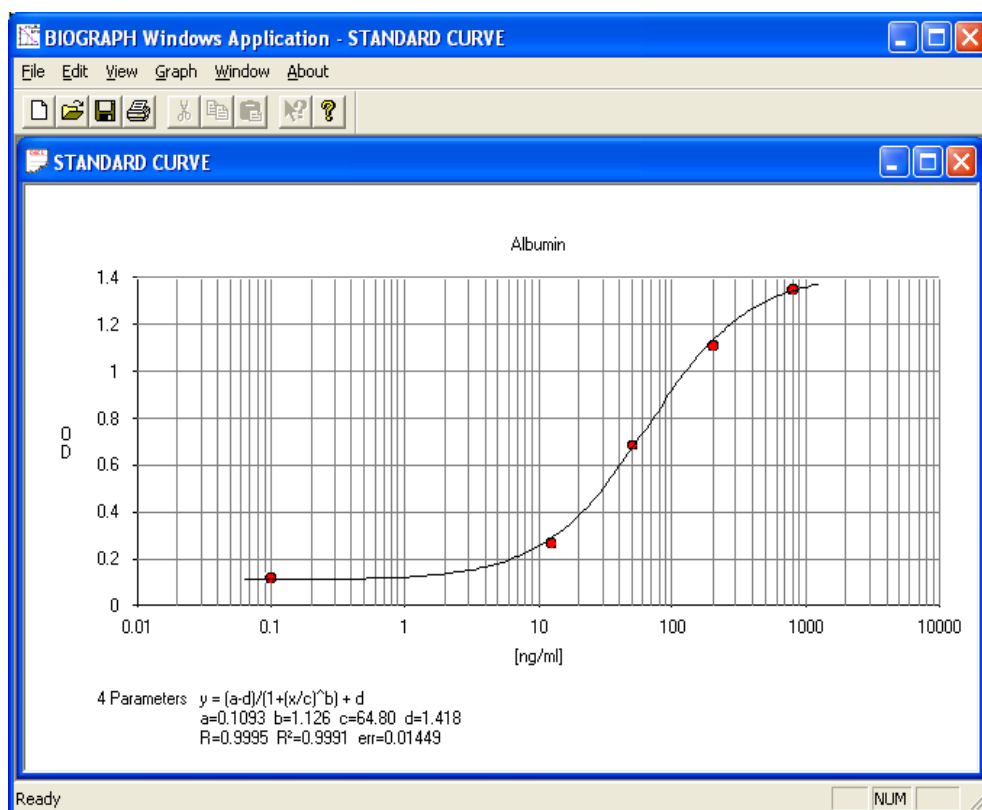
Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl STD** (Standard), **CTRL** (Kontrollen) und **Patientenproben** pro Vertiefung in Doppelbestimmungen pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln auf Horizontalmischer inkubieren.
3. Den Inhalt der Wells verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100 µl CONJ** (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Den Inhalt der Wells verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100 µl SUB** (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
8. **10-20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis eine ausreichend große Farbdifferenz auftritt.
9. **50 µl STOP** (Stopplösung) in jede Vertiefung pipettieren.
10. Die 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, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

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]	800	200	50	12.5	0
OD Mittelwert	1.353	1.114	0.687	0.269	0.118

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden.

Stuhlproben

Die ermittelte Albuminkonzentration der Stuhlprobe wird wie im folgenden Beispiel berechnet:

Einwaage: 80 mg (1ml Stuhl = 1g) = 0,08 ml

Verdünnungsstufe 1: $5\text{ml} / 0,08\text{ml} = 62,5$

Verdünnungsstufe 2: 5

Verdünnungsfaktor: 312,5

Die ermittelte Albuminkonzentration der Stuhlprobe wird mit **312.5** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.**

Urin

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

11. EINSCHRÄNKUNGEN

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

12. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

Stuhl : < 9.2 mg/l (n = 76)

Urin: 5 – 16 mg/l

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von einer Probe innerhalb einer Messserie wurde geprüft.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	Albumin [mg/l]	Intra-Assay Vk [%]
1	50	5

Inter-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von einer Probe an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft.

Inter-Assay VK n= 20

Probe	Albumin [mg/l]	Inter-Assay Vk [%]
1	50	8

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 12.5 ng/ml.

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Stuhl gefunden.

14. LITERATUR

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

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Nur zur in vitro Diagnostik.
- 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 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.
- Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden.
- 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

Albumin ELISA Kit

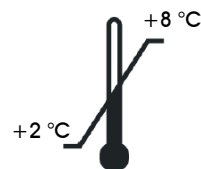
Super sensitive

For the in vitro determination of Albumin in urine and stool

Valid from 06.04.2010



K6330



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

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik Assay is intended for the quantitative determination of **Albumin** in urine and stool. For in vitro diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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

Indication

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

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

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Label	Kit Components	Quantity
K 6330MTP	PLATE	Precoated strips	96
K 6330WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate (10x)	1 x 100 ml
K 6330PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 100 ml
K6330VP	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	1 x 15 ml
K 6330K	CONJ	Conjugate, (rabbit-anti-Albumin peroxidase-labeled)	1 x 50 µl
K 6330ST	STD	Calibrators, lyophilized (0, 12.5, 50, 200, 800 µg/l)	4 x 5 vials
K 6330KO1	CTRL	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K 6330KO2	CTRL	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K 6330TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 6330AC	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 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) must be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 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 using 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** (calibrators) and the **CTRL** (controls) 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 Calibrators and Controls are not stable and can not be stored.**
- The **CONJ** (conjugate, POD-Antibody) must be diluted **1:400** in **CONJBUF** (conjugate dilution buffer, e.g. 25 µl CONJ + 10 ml CONJBUF). The **CONJ** (conjugate, POD-Antibody) is stable at 2 -8 °C until the expiry date given on the label. **Diluted antibody is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the date of expiry (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.
- 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

Urine

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

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

10 µl sample +1990 µl SAMPLEBUF (sample dilution buffer).

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.

Dilute supernatant **1:5** in **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer; e.g. 200 µl supernatant + 800 µl SAMPLEBUF). Use **100 µl** of the obtained solution for the test.

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

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

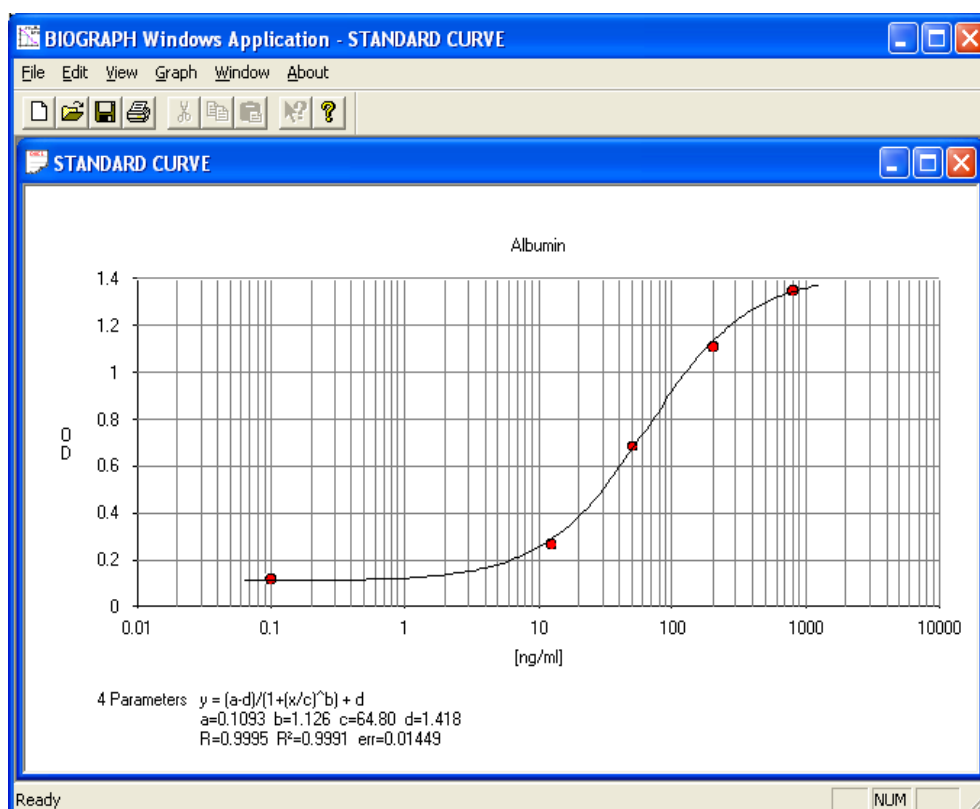
Wash the precoated **PLATE** (microtiter plate) **5 x with 250 µl** diluted wash buffer. After the final washing step, the inverted PLATE should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution. This is valid for all following washing steps. Carry out each determination in duplicate for standards, controls and samples.

1. Add **100 µl STD** (Standard), **CTRL** (Controls) and diluted **patient samples** into respective wells.
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 diluted conjugate** in each well.
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) in each well.
8. Incubate for **10-20 minutes** at room temperature.
9. Add **50 µl STOP** (stop solution) in each well 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

We recommend the 4-parameter-algorithm for evaluation of the test results. Alternatively, a point-to-point-calculation or a spline-algorithm can be used. Before the automatic evaluation of the results, the plausibility of the pairs of values should be examined. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Typical calibration curve



Concentration [ng/ml]	800	200	50	12.5	0
OD mean values	1.353	1.114	0.687	0.269	0.118

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

Faeces

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

Weight: 80 mg (1ml stool = 1g) = 0,08 ml
Dilution step 1: 5ml / 0,08ml = 62,5
Dilution step 2: 5
Dilution factor: 312.5

Multiply the result by **312.5** to get the concentration of the sample. **The dilution factor depends on the weight of the faeces.**

Urine

To get the Albumin concentration in urine samples the observed values must be multiplied by **200**.

11. LIMITATIONS

Samples with Albumin 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. 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

Normal range

Albumin in stool: < 9.2 mg/l (n = 76)
Albumin in urine: 5 - 16 mg/l

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay

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

Intra-Assay CV n=20

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

Inter-Assay

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

Inter-Assay CV n = 20

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

Sensitivity

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

Cross reactivity

No cross reactivity to other plasma proteins in faeces.

14. REFERENCES

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

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.
- 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.
- All reagents in the kit package are for in vitro diagnostic use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- 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 shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number