

Hämoglobin ELISA

Zur in vitro Bestimmung des Hämoglobin in Stuhl

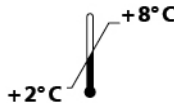
Hemoglobin ELISA Kit

For the in vitro determination of Hemoglobin in stool

Gültig ab / Valid from 06.06.2011



K 7816D



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim

Tel.: ++49 6251 70190-0

Fax: ++ 49 6251 849430

e.mail: Info@Immundiagnostik.com

www.Immundiagnostik.com

Inhalt

Content	14
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
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
Hinweise	6
Pipettierschema	7
10. ERGEBNISSE	8
11. EINSCHRÄNKUNGEN	8
12. QUALITÄTSKONTROLLE	8
Erwartete Ergebnisse	8
13. TESTCHARAKTERISTIKA	9
Sensitivität und Spezifität	9
14. LITERATUR	10
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10

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 eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer Mastereichkurve lässt sich die Konzentration des Hämoglobins der Proben ermitteln.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K 7816D MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 7816D WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 7816D EP	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat 2.5 x	1 x 100 ml
K 7816D PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 7816D K	CONJ	Konjugat, (Maus anti human Hb, Peroxidase-markiert), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7816D ST	STD	Standards, lyophilisiert (50; 10; 3.3; 0.67; 0 µg/g)	4 x 5 vials
K 7816D KO	CTRL	Kontrollen, lyophilisiert	4 x 2 vials
K 7816D TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7816D AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- 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)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25°C (≤18,2 MΩ cm).

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 Reinstwasser verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Der 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 Reinstwasser verdünnt werden (90 ml Konzentrat + 135 ml Reinstwasser). 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.
- **CTRL** (Kontrollen) und **STD** (Standards) werden mit **500 µl** Reinstwasser rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrollen können nicht gelagert werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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.

8. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlprobenextraktion

1. Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 1,5 ml Puffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	1,5 ml
Verdünnungsfaktor:	1:100

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o.Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer **befüllen**.

- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrchen solange mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres „einweichen“ (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspensierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u.Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (türkiser Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Bei dem Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

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

Die Stuhlsuspension ist 3 Tage bei 2-8°C haltbar.

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 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. **50 µl SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) in jede Vertiefung vorlegen.
2. **50 µl je CTRL/STD/SAMPLE** (Kontrolle/Standard/Probe) in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren (siehe beiliegende Plattenbelegung).
3. **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18-26 °C) inkubieren.
4. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF** waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5. **100 µl CONJ** (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
6. **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18-26 °C) inkubieren.
7. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF** waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8. **100 µl SUB** (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren.
9. **15 Minuten** bei Raumtemperatur (18-26 °C) inkubieren
10. **50 µl STOP** (Stopplösung) in jede Vertiefung pipettieren.
11. **Extinktion sofort** im Mikrotiterplattenphotometer **bei 450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen.

10. ERGEBNISSE

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

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

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

Nach jeder 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:

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

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Hämoglobin Konzentration größer 50 µg/ml 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 Ergebnisse nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

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

(1g Stuhl Δ 1ml)

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 $0.042 \mu\text{g/ml}$.

Probe	Mittelwert [$\mu\text{g/ml}$]	SD	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/ml}$]
1	0.025	0.009	0.042

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). **IFOB**T, 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 Pipetiertervolumina 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

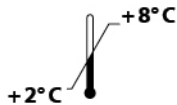
Hemoglobin ELISA Kit

For the in vitro determination of Hemoglobin in stool

Valid from 06.06.2011



K 7816D



Immundiagnostik AG

Content

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	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
Extraction of the stool sample	18
9. ASSAY PROCEDURE	19
Procedural notes	19
Test procedure	20
10. RESULTS	21
11. LIMITATIONS	21
12. QUALITY CONTROL	21
Expected values	21
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
Sensitivity and Specificity	22
14. LITERATURE	23
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23

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. Hemoglobin, present in the patient samples, is quantified by referring the optical density of patient's samples to a Lot-dependant master calibration curve. This is done by using Reference/Calibrator that is run with each test.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Label	Kit Components	Quantity
K 7816D MTP	PLATE	One holder with pre-coated strips	12 x 8
K 7816D WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate (10x)	2 x 100 ml
K 7816D EP	EXBUF	Extraction buffer concentrate 2.5 x	1 x 100 ml
K 7816D PV	SAMPLEBUF	Dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 7816D K	CONJ	Conjugate, (mouse-anti humanHb, peroxidase-labeled), ready-to-use	1 x 15 ml
K 7816D ST	STD	Standards, lyophilized (50; 10; 3.3; 0.67; 0 µg/g)	4 x 5 vials
K 7816D KO	CTRL	Controls, lyophilized	4 x 2 vials
K 7816D TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 7816D AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- 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)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25°C (≤18.2 MΩ cm).

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 ultra pure water **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 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 ultra pure water **1:2.5** before use (90 ml concentrate + 135 ml ultra pure water). 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 **CTRL** (controls) and **STD** (standards) must be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and control are not stable.**
- 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

Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instruction for use:

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the used amount of stool sample and the volume of the buffer.

SAS with 1.5 ml Buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	1.5 ml
Dilution Factor:	1:100

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw Stool Sample has to be thawed. For remarkably inhomogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) **Fill the empty sample tube with 1.5 ml** of ready-to-use extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.

- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert yellow dipstick into sample. The lower part of the dipstick exhibits notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off and leave 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ca. 10 minutes improves the result.
- e) After suspension of the sample, allow to dissolve for ca. 10 minutes until no sediment remains on the bottom. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the turquoise ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure, the sediment will not be dispersed again.

The sample suspension is ready for use.

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

The sample suspension is stable for 3 days at 2-8°C.

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 in each well 50 µl of SAMPLEBUF (sample dilution buffer)
2.	Then 50 µl of each CTRL/STD/SAMPLE (control/standard/sample) into respective well (see template given in the test kit).
3.	Incubate for 1 hour at room temperature (18-26 °C).
4.	Decant the content of the plate and wash the wells 5 x with 250µl diluted WASHBUF.
5.	Add 100 µl of CONJ (Peroxidase-labeled antibody).
6.	Incubate for 1 hour at room temperature (18-26 °C).
7.	Decant the content of the plate and wash the wells 5 x with 250µl diluted WASHBUF.
8.	Add 100 µl SUB (TMB substrate).
9.	Incubate for 15 minutes at room temperature (18-26 °C).
10.	Add 50 µl STOP (stop solution) and mix shortly.
11.	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.

10. RESULTS

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

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

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

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

The plausibility of replicate values should always be examined after automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the replicate values should be done manually by the operator.

Faeces

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

11. LIMITATIONS

Samples with Hemoglobin levels greater than 50 µg/ml 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) $< 2 \mu\text{g/ml} \triangleq < 2 \mu\text{g/g}$
(1g Stool $\triangleq$ 1ml)

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

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 0.042 µg/ml was obtained.

Sample	Mean Value [µg/ml]	SD	Detection limit [µg/ml]
1	0.025	0.009	0.042

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 (89.32-99.63)

* $P < 0.05$ 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