

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 26.10.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 6330

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C



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

Tel.: ++49 6251 70190-0

Fax: ++ 49 6251 849430

e.mail: Immundiagnostik@t-online.de

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 VORSICHTSMABNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
HINWEISE	7
PIPETTIERSHEMA	7
10. ERGEBNISSE	8
MUSTEREICHKURVE	8
11. EINSCHRÄNKUNGEN	9
12. QUALITÄTSKONTROLLE	9
ERWARTETE ERGEBNISSE	9
13. TESTCHARAKTERISTIKA	10
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	10
SENSITIVITÄT	10
KREUZREAKTIVITÄT	10
14. LITERATUR	10
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11

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

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 Plasma, Urin und im 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 (hAlbumin) aus Plasma, Serum, 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.	Kit Komponenten	Menge
K 6330MTP	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 6330WP	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 6330PV	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K6330VP	Konjugat Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6330K	Konjugat, (Kaninchen anti Albumin, Peroxidase-markiert)	1 x 50 µl
K 6330ST	Standards, lyophilisiert (0; 12.5; 50; 200; 800 ng/ml)	4 x 5 vials
K 6330KO	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial
K 6330TMB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6330AC	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bei Mehrfachansatz der Platte ist bitte darauf zu achten, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden** (z.B. Peroxidase-markierter Antikörper ist in der größten Verdünnungsstufe nicht haltbar). Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen (innerhalb des angegebenen Verfallsdatums) verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** muss vor Gebrauch **1:10** in aqua dest. verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua dest.). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur/Wasserbad 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** 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.
- Das **Konjugat** (POD-Antikörper) ist 1:400 in Konjugat Verdünnungspuffer zu verdünnen (25 µl POD-Antikörper in 10 ml Puffer). Der unverdünnte Peroxidase-markierte Antikörper ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil, siehe Etikett. **Verdünnte Lösung kann nicht aufbewahrt werden.**
- **Standards** und **Kontrolle** in **500 µl** aqua dest. rekonstituieren. Um eine vollständige Lösung der rekonstituierten Standards und Kontrollen zu gewährleisten müssen sie mindestens 10 Min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen stehen bleiben. **Die rekonstituierten Standards und Kontrollen sind nicht stabil.**

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- 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 Probenverdünnungspuffer verdünnen,
z.B. 10 µl Probe + 1990 µl Probenverdünnungspuffer.

Stuhlproben

Ca. **100 mg** Stuhl einwiegen, die genau eingewogene Stuhlmenge notieren, in **5 ml** Waschpuffer lösen und anschließend sehr gut mischen. Danach die Suspension für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugieren. 1 ml Überstand abnehmen, in ein Eppendorfröhrchen überführen und ein weiteres Mal in einer Eppendorfszentrifuge bei 13000 rpm für 5 Min. zentrifugieren. Danach den Überstand **1:5** mit Probenverdünnungspuffer weiterverdünnen (z.B. 200 µl Überstand + 800 µl Probenverdünnungspuffer). 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 Pipettiervolumen 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 Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen um die Waschpufferreste vollständig zu entfernen. Dies gilt für alle folgenden Waschschrte.

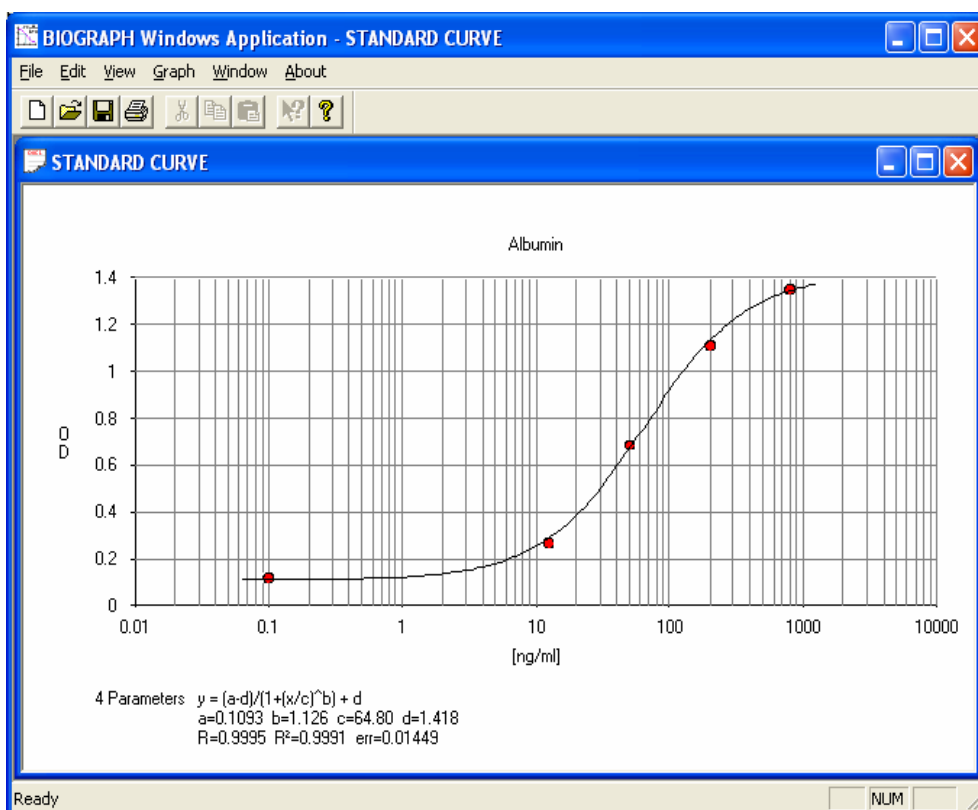
Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl** Standards, Kontrollen, Patientenproben in die Vertiefungen pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln auf Horizontalmischer inkubieren.
3. Inhalt der Platte verwerfen, und die Vertiefungen **5 x mit 250 µl** Waschpuffer waschen.
4. **100 µl** verdünnten POD-Antikörper zugeben.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Inhalt der Platte verwerfen, und die Vertiefungen **5 x mit 250 µl** Waschpuffer waschen.
7. **100 µl** TMB-Lösung zugeben und **10-20 Min.** bei Raumtemperatur inkubieren bis ausreichend große Farbdifferenzen eingetreten sind.
8. **50 µl** Stopplösung zusetzen.
9. Die Extinktion wird **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) gemessen. 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 die Kontrollen oder Urin/Stuhl Pools, bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Proben nicht gewährleisten.

*Erwartete Ergebnisse***Normwerte:**

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

Es wird die Reproduzierbarkeit von einer Probe an unterschiedlichen Tagen 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.
- 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.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, 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.

Manual

Albumin ELISA Kit

Super sensitive

For the in vitro determination of Albumin in urine and stool

Gültig ab/valid from 26.10.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 6330

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C

CE

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 reflects the major protein in human plasma (40-60%). It is synthesized in the liver depending of protein uptake. Albumin in fecal samples refers to an inflammation 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 microtiter plates and a second anti-Albumin antibody is conjugated to peroxidase (POD). Albumin in samples is bound to the immobilized antibody and after a washing step, to remove all unbound material the quantification of bound Albumin is carried out by adding a POD-labeled anti-Albumin antibody. After a second washing step substrate is added. The enzyme reaction is stopped and the absorbance is measured photometrically at 450 nm.

The intensity of the formed color is directly proportional to the concentration of Albumin in the samples.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Kit Components	Quantity
K 6330MTP	precoated strips	12 x 8
K 6330WP	ELISA wash buffer concentrate (10x)	1 x 100 ml
K 6330PV	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 100 ml
K 6330VP	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	1 x 15 ml
K 6330K	Conjugate, (rabbit-anti-Albumin peroxidase-labeled)	1 x 50 µl
K 6330ST	Calibrators, lyophilized (0, 12.5, 50, 200, 800 µg/l)	4 x 5 vials
K 6330KO	Control, lyophilized	4 x 1 vial
K 6330TMB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 6330AC	ELISA stop solution, ready to use	1 x 7 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Deionized water
- Precision pipettors calibrated to deliver 10-100 µl
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Microplate reader 450 nm

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, please make sure that the reagents are carefully stored as mentioned. Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.
- The **ELISA wash buffer concentrate** should be diluted with aqua dest. **1:10** before use (add 450 ml aqua dest. to 50 ml concentrate). Crystals could occur due to high salt concentration. The crystals have to be resuspended **before dilution of the buffer solutions** using a water bath (37°C). The buffer concentrates are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted solutions could be stored at 2-8°C for 1 month.
- **Calibrators** and **Controls** must be reconstituted with **500 µl aqua dest.** Allow the vial contents to dissolve for **10 minutes** and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted Calibrators and Controls are not stable and can not be stored.**
- The **Conjugate** (POD Antibody) must be diluted **1:400** in Conjugate dilution buffer (25 µl POD antibody in 10 ml buffer). The antibody is stable at 2-4°C until expiry date given on the label. **Diluted antibody solution 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 sample dilution buffer, e.g.

10 µl sample + 1990 µl sample dilution buffer.

Faeces

Give about **100 mg** of the sample (please note the real weight for the calculation) to **5 ml** of the wash buffer and mix. Centrifuge the diluted sample for 10 min at 3000 rpm. 1 ml supernatant is given into an Eppendorf tube and centrifuged once more at 13.000 rpm for 5 min. For the assay, the supernatant is diluted **1:5** in sample dilution buffer (200 µl supernatant + 800 µl sample dilution buffer). **100 µl** of this solution is used for the assay.

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

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

Immundiagnostik recommends the use of the sample 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 microtiter plate 5 x with 250 µl of diluted ELISA wash buffer. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution. This is valid for all following washing steps. Perform each determination in duplicate for standards, controls and samples.

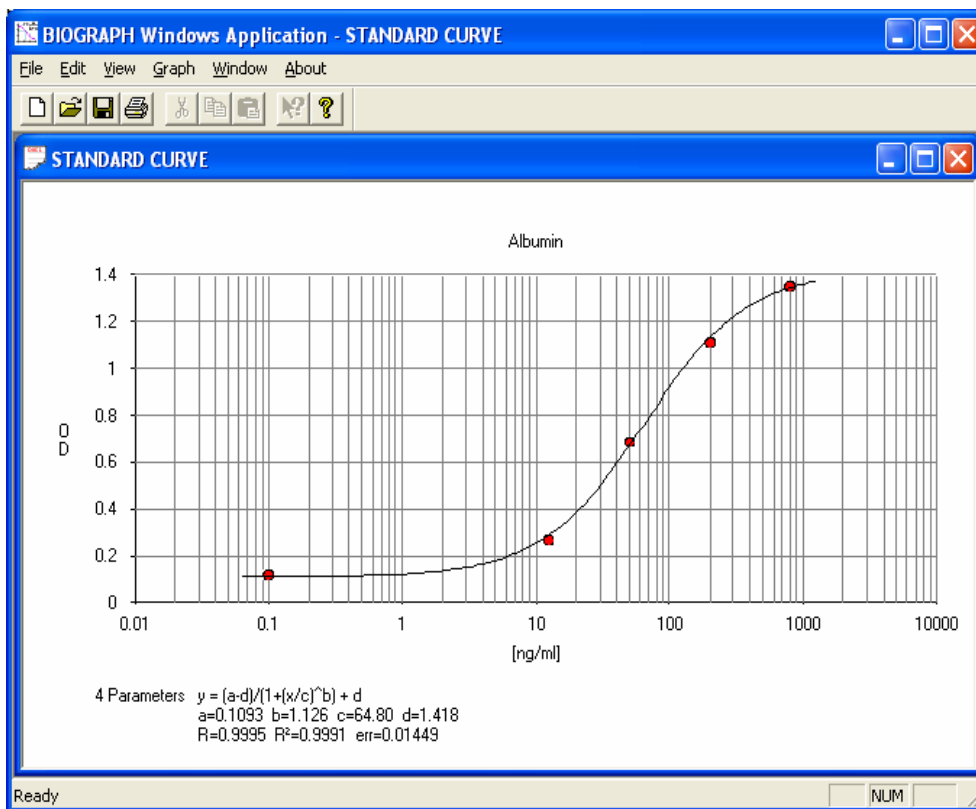
1. Add **100 µl** standard and control solutions and prediluted patient samples.
2. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
3. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250µl** ELISA wash buffer.
4. Add **100 µl** diluted Peroxidase-labeled anti-Albumin 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** ELISA wash buffer.
7. Add **100 µl** TMB substrate solution. Incubate for **10-20 minutes** at room temperature.
8. Add **50 µl** stop solution and mix shortly.
9. Determine absorption with an ELISA reader at **450 nm** against 620 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 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]	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 in place of data generations at the time of the assay.

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 real concentration. **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 or serum pools 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 range

Albumin in stool: < 9.2 mg/l (n = 76)

Albumin in urine: 5 - 16 mg/l

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Inter-Assay CV (n = 20)

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

Intra-Assay CV (n=20)

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

Sensitivity

The sensitivity or minimum detection limit of this assay is defined as the smallest single value that can be distinguished from zero at the 2 x standard variation as confidence limit. ($B0 + 2 SD = 12.5 \text{ ng/l}$)

Cross reactivity

No cross reactivity to other plasma proteins in faeces

14. REFERENCES

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

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.
- For *in vitro* diagnostic use only.
- 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.
- 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.