

Arbeitsanleitung/Manual

Hb / Hp–Komplex ELISA Kit

*Zur in vitro Bestimmung des Hämoglobin/Haptoglobin Komplex
in Stuhl*

Hb / Hp–Complex ELISA Kit

*For the in vitro determination of Hemoglobin/Haptoglobin
Complex in stool*

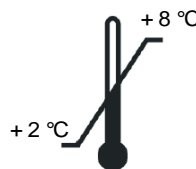
Gültig ab/valid from 23.03.2006



K 7817



96



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	4
2. EINLEITUNG	4
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	6
7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
8. PROBENVORBEREITUNG	7
STUHLPROBENEXTRAKTION	7
PROBENVERDÜNNUNG	9
9. TESTDURCHFÜHRUNG	9
HINWEISE	9
PIPETTIERSHEMA	10
10. ERGEBNISSE	11
MUSTEREICHKURVE	11
11. EINSCHRÄNKUNGEN	12
12. QUALITÄTSKONTROLLE	12
ERWARTETE ERGEBNISSE	12
13. TESTCHARAKTERISTIKA	13
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	13
WIEDERFINDUNG	14
SENSITIVITÄT	15
KREUZREAKTIVITÄT	15
LINEARITÄT	15
14. LITERATUR	15
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	16

Table of contents	Page
1. INTENDED USE	18
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	18
3. PRINCIPLE OF THE TEST	18
4. MATERIAL SUPPLIED	19
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	20
7. PRECAUTIONS	21
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	21
EXTRACTION OF THE STOOL SAMPLE	21
DILUTION OF SAMPLES	23
9. ASSAY PROCEDURE	23
PROCEDURAL NOTES	23
TEST PROCEDURE	24
10. RESULTS	25
TYPICAL CALIBRATION CURVE	25
11. LIMITATIONS	26
12. QUALITY CONTROL	26
EXPECTED VALUES	26
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	27
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	27
RECOVERY	28
SENSITIVITY	29
CROSS REACTIVITY	29
SAMPLE DILUTION	29
14. REFERENCES	29
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	30

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Hämoglobin-/Haptoglobin Komplex** in Stuhl. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Der Hämoglobin/Haptoglobin Komplex kann als Marker für gastrointestinale Blutungen verwendet werden. Die Untersuchung okkulten Blutes wird in den meisten Fällen zur Erkennung kolorektaler Karzinome durchgeführt. Der immunologische Test für den Nachweis des Hämoglobin/Haptoglobin Komplexes im Stuhl basiert auf Antikörpern, die spezifisch das **humane** Molekül erkennen und damit im Gegensatz zu den Schnelltests den Vorteil bieten, dass sie ernährungsunabhängige Resultate liefern.

Indikation

- Nachweis von Blutungsquellen im unteren Gastrointestinaltrakt
- Marker für Colitis Ulcerosa bzw. Morbus Crohn
- Nachweis kolorektaler Karzinome
- Nachweis kolorektaler Polypen

3. TESTPRINZIP

Der vorliegende Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Erfassung des humanen Hämoglobin/Haptoglobin Komplexes im Stuhl. Proben und Standards werden in die mit anti-Haptoglobin Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gegeben. Nach einer Inkubation werden nichtgebundene Komponenten entfernt. Das gebundene Antigen wird mittels eines Antikörper-POD/TMB Systems nachgewiesen. Die Quantifizierung erfolgt durch Bestimmung der Extinktion bei 450 nm. Anhand einer mitgeführten Eichkurve lässt sich die Konzentration des Hämoglobin/Haptoglobin Komplexes der Proben ermitteln.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K 7817MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 7817WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 7817K	CONJ	POD Antikörper, (Kaninchen anti human Hb, Peroxidase-markiert)	1 x 200 µl
K 7817PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 7817ST	STD	Standard, lyophilisiert (0; 0.1; 0.4; 1.6; 6.4 U/l)	5 vials
K 7817ko	CTRL	Kontrolle	1 vials
K 7817MB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7817AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

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

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** (WASHBUF) 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.
- **Standards (STD)** und **Kontrolle (CTRL)** werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrolle können nicht gelagert werden.
- Das **Konjugat** (CONJ) (POD-markierter Antikörper) wird **1:100** in **Probenverdünnungspuffer** (SAMPLEBUF) verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml SAMPLEBUF). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- 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 (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H₂SO₄ 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

Der verdünnte Waschpuffer wird als Probenextraktionspuffer verwendet.

Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

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

Puffervolumen konstant: 5 ml

Verdünnungsfaktor konstant: 1:50

2. Alternativ kann eine Stuhlprobe im Bereich von **80 - 120 mg** eingewogen werden. **Exakte Menge von jeder Probe notieren!**
 - a. Jede einzelne Probe wird in **5 ml** Puffer unabhängig von der eingewogenen Menge suspendiert.

Puffervolumen konstant: 5 ml

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

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

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

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

Puffervolumen variabel

Verdünnungsfaktor konstant: 1:50

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

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

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

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

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

Probenverdünnung

Stuhlproben

Der Überstand nach der Zentrifugation (Verdünnung I) wird **1:100 mit Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF)** verdünnt. Zum Beispiel:

10 µl Überstand (Verdünnung I)+990 µl SAMPLEBUF=1:100 (**Verdünnung II**)

100 µl des Überstandes der **Verdünnung II** wird im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Die Stuhlsuspension ist nicht haltbar. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen.

Stuhlproben können bei -20°C 4 Wochen gelagert werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

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 **5x mit je 250 µl** verdünnter Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

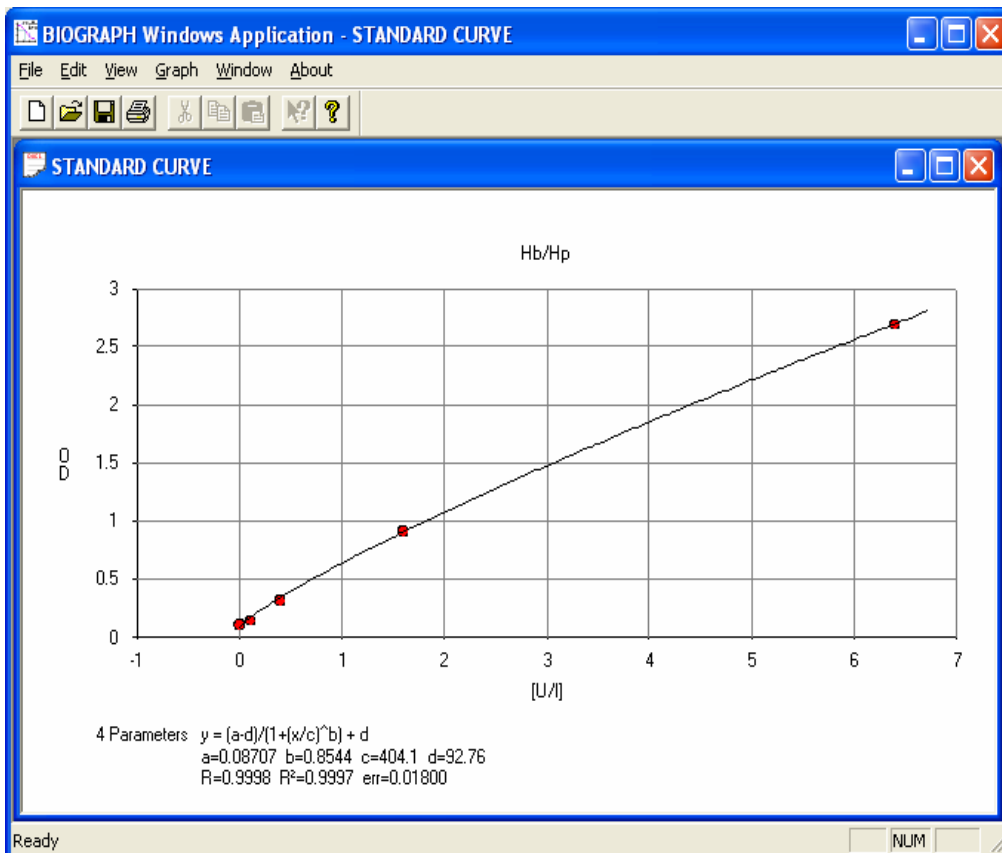
Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl STD/CTRL/SAMPLE** (Standard/Kontrolle/Probe in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünnter WASHBUF waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100 µl** vorverdünntes **CONJ** (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 µl** verdünnter WASHBUF waschen. Mikrotiterplatte 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 [U/l]	6.4	1.6	0.4	0.1	0
OD Mittelwert	2.509	1.717	0.597	0.244	0.167

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

Stuhlproben

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

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

Verdünnungsstufe 1: 5 ml / 0,08 ml = 62,5

Verdünnungsstufe 2: 100

Verdünnungsfaktor: 62,5 x 100 = 6250

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **6250** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.**

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Hämoglobin/Haptoglobin Konzentration größer dem größten Standard sollten mit ELISA Waschpuffer verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

Hb/Hp-Komplex Konzentration (Stuhl): < 2.5 U/g (U/ml)

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden 20-mal in einem Hb/Hp ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	Hb/Hp Mittelwert [mU/g]	Intra-Assay Vk [%]
1	29.4	4
2	33.2	3

Inter-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im Hp/Hp ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 20

Probe	Hp/Hb Mittelwert [mU/g]	Inter-Assay Vk [%]
1	39.2	8
2	38.7	9

Wiederfindung

Zwei verschiedene Proben wurden mit unterschiedlichen Hp/Hb-Kalibrator Konzentrationen gespiked und gemessen.

Wiederfindung n=4

Probe [mU/g]	Spike [mU/g]	<i>Hp/Hb Erwartet</i> [mU/g]	<i>Hp/Hb Gemessen</i> [mU/g]
0.15	0.4	0.55	0.45
0.15	4	4.15	4.4
0.15	0.8	0.95	1.1
0.15	0.2	0.35	0.31
0.085	0.4	0.49	0.51
0.085	4	4.1	3.8
0.085	0.2	0.28	0.23
0.085	0.004	0.09	0.12

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null.

Probe	Hp/Hb Mittelwert [OD]	Standardab- weichung	Nachweis- grenze [U/ml]
1	0.060	0.005	0.15

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Plasmaproteinen im Stuhl gefunden.

Linearität

n= 2

Zwei Proben wurden mit Waschpuffer verdünnt und gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle gezeigt:

Probe	Verdünnung	Erwartet [mU/g]	Gemessen [mU/g]
A	unverdünnt	3.5	3.5
	1:2	1.7	1.5
	1:4	0.9	0.8
	1:8	0.4	0.4
B	unverdünnt	1.63	1.63
	1:2	0.8	0.5
	1:4	0.4	0.34
	1:8	0.2	0.2

14. LITERATUR

- 1.Lüthgens, K. et al. (1998) *Clin. Lab.* 44:543-551
- 2.Thomas, L. 5. Auflage 5, *Labor und Diagnose*
- 3.Schmidt-Gayk, H. et al. (1994) *Clin. 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.
- 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 Pipettiervolumina 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, zurück zu senden.

Manual

Hb / Hp-Complex ELISA Kit

*For the in vitro determination of Hemoglobin/Haptoglobin
Complex in stool*

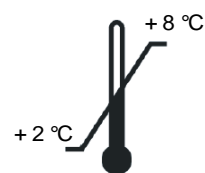
Gültig ab/valid from 23.03.2006



K 7817



96



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of **Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex** in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

In contrast to other commercially available **Hemoglobin** quick tests, this **Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex 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 **Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex** determination increases the clinical specificity and sensitivity.

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-/Haptoglobin-Complex in stool.

Standards, controls and diluted patient samples which are assayed for Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex are added to the wells of a microtiter plate coated with high affine anti-Haptoglobin antibodies. During the first incubation step, the Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex is bound by the immobilized antibodies. A peroxidase-labeled antibody is then added into each microtiter well and a "sandwich" of capture antibody - Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex – peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex 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 standard. Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex present in the patient samples is determined from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Label	Kit Components	Quantity
K 7817MTP	PLATE	one holder with precoated strips	12 x 8
K 7817WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate (10x)	2 x 100 ml
K 7817PV	CONJ	Dilution buffer, ready-to-use	1 x 100 ml
K 7817K	SAMPLEBUF	Conjugate, (Rabbit anti Hb, POD-labeled)	1 x 200 µl
K 7817ST	STD	Standard, lyophil. (0; 0.1; 0.4; 1.6; 6.4 U/l)	5 vials
K 7817ko	CTRL	Controls	1 x 4 vials
K 7817TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 7817AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	1 x 7 ml

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

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C before dilution. The **buffer concentrate** (WASHBUF) 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 **standards** (STD) and **control** (CTRL) must be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted standards and control are **not stable**.
- The **conjugate** (CONJ) (POD-antibody) must be diluted **1:100** in **sample dilution buffer** (SAMPLEBUF) (100 µl CONJ + 10 ml SAMPLEBUF). The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Extraction of the stool sample

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

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

Constant buffer volume: 5 ml

Constant dilution factor: 1:50

2. Alternatively, stool samples can be manually weighted within the range of **80 – 120 mg**. Please note the exact sample amount!
 - a. Add **5 ml** buffer to the stool sample not depending on the sample amount.

Constant buffer volume: 5 ml

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

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

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

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

Variable buffer volume

Constant dilution factor: 1:50

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

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

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

Afterwards, mix stool sample and buffer; vortex for at least 30 sec. depending on the stool consistency.

Transfer approx. 1 ml stool suspension (**dilution step I**) to an Eppendorf-tube and centrifuge for 5 minutes at 13000 rpm (= 13000 g). The resulting supernatant can be stored at **-20 °C for about 1 month**.

Dilution of samples

Stool samples

The supernatant of the centrifugation (dilution step I) is diluted **1:100 in sample dilution buffer (SAMPLEBUF)**. For example:

10 µl supernatant of dilution I + 990 µl SAMPLEBUF = 1:100 (**dilution step II**)

For analysis, pipette **100 µl** of the supernatant of **dilution step II** per well.

The supernatant is not stable and can not be stored. We recommend to weight fresh sample amount for a new assay, if the analysis should be repeated.

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

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Quality control guidelines should be followed.
- 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 ELISA wash buffer**. 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.

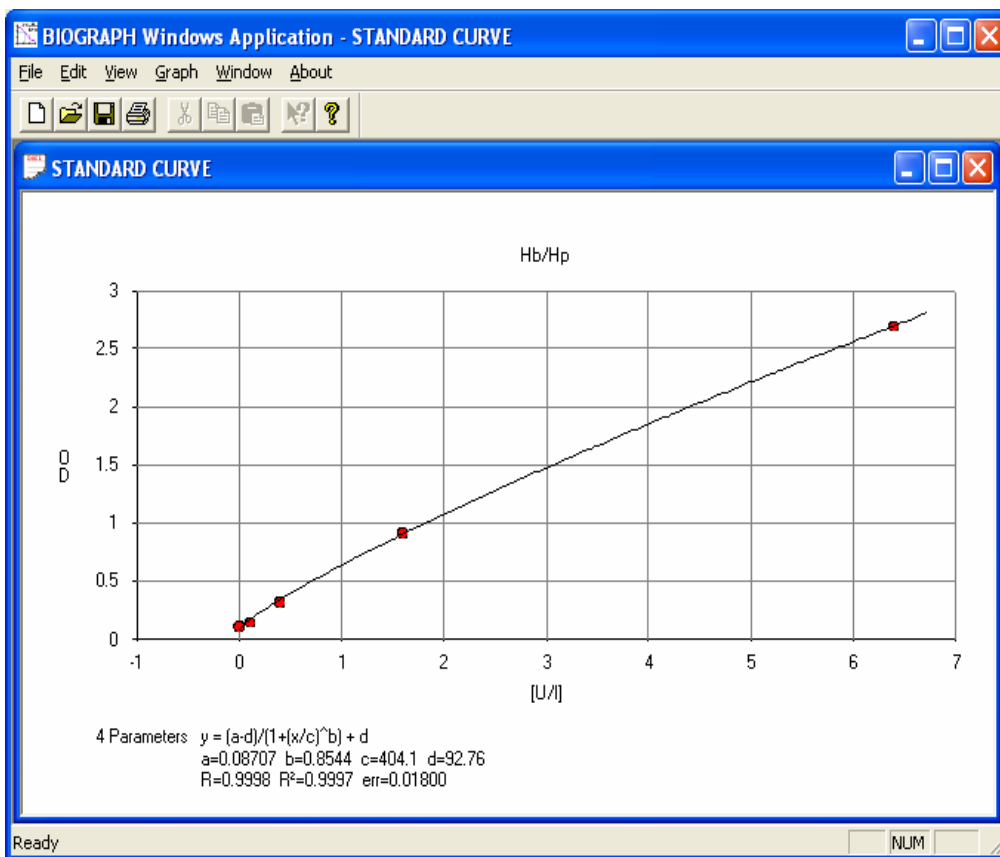
1. Add **100 µl STD/CTRL/SAMPLE** (Standards/Control/Sample) into respective well.
2. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
3. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250µl** diluted WASHBUF.
4. Add **100 µl** pre-diluted **CONJ** (Peroxidase-labeled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

Typical calibration curve



Concentration [U/I]	6.4	1.6	0.4	0.1	0
OD mean values	2.509	1.717	0.597	0.244	0.167

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

Faeces

Calculate Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex concentration of stool samples as follows:

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

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

Dilution step 2: 100

Dilution factor: 62,5 x 100= 6250

For the calculation of the Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex concentration the result must be multiplied by **6250**.

The dilution factor varies depending on the sample amount which must be considered in the subsequent calculation.

11. LIMITATIONS

Samples with Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex levels greater than the highest calibrator value should be diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

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

Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex (stool) < 2,5 U/ml (U/ml)

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

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex (Hb/Hp) ELISA test was calculated from 20 replicate determinations on each of two samples.

Intra-Assay CV n= 20

Sample	Hb/Hp Mean value [mU/g]	Intra-Assay CV
		[%]
1	29.4	4
2	33.2	3

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik Hemoglobin-/Haptoglobin-Complex (Hb/Hp) ELISA test was calculated from data on two samples obtained in 20 different assays by three technicians using two different lots of reagents over a period of three months.

Inter-Assay CV n= 20

Sample	Hb/Hp Mean value [mU/g]	Inter-Assay CV
		[%]
1	39.2	8.7
2	38.7	9.7

Recovery

Two samples were spiked with Hemoglobin-/Haptoglobin calibrator and measured with this assay.

Recovery n=4

Sample [mU/g]	Spike [mU/g]	Hb/Hp Expected [mU/g]	Hb/Hp Measured
			[mU/g]
0.15	0.4	0.55	0.45
0.15	4	4.15	4.4
0.15	0.8	0.95	1.1
0.15	0.2	0.35	0.31
0.085	0.4	0.9	0.51
0.085	4	4.1	3.8
0.085	0.2	0.28	0.23
0.085	0.04	0.09	0.12

Sensitivity

The detection limit was defined as $B_0 + 2SD$. The zero-standard was measured 20 times.

n=20

Sample	Hb/Hp Mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [U/ml]
1	0.060	0.005	0.15

Cross reactivity

No cross reactivity to other plasma proteins in stool.

Sample dilution

Linearity n= 2

Two patient samples were diluted with wash buffer. The results are shown below:

Sample	Dilution	Expected [mU/g]	Measured [mU/g]
A	undiluted	3.5	3.5
	1:2	1.7	1.5
	1:4	0.9	0.8
	1:8	0.4	0.4
B	undiluted	1.63	1.63
	1:2	0.8	0.5
	1:4	0.4	0.34
	1:8	0.2	0.2

14. REFERENCES

1. Lüthgens et al.: 1998; Clin. Lab. 44, 543
2. Thomas, L.: 5. Auflage 5, Labor und Diagnose
3. Schmidt-Gayk 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.
- 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.