

IDK[®] Hb-Hp-Komplex ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von Hämoglobin-Haptoglobin
in Stuhl*

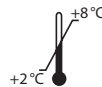
IDK[®] Hb/Hp complex ELISA

*For the in vitro determination of hemoglobin/haptoglobin
in stool*

Gültig ab / Valid from 2018-06-21



K 7817D



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	4
<i>Lagerung der Proben</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
15. LITERATUR	11
<i>Allgemeine Literatur</i>	11
<i>Publikationen mit dem IDK® Hb-Hp-Komplex ELISA</i>	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung des **Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes** in Stuhl geeignet. 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.

Indikationen:

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7817D	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7817D	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7817D	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	1 x 100 ml
K 7817D	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 7817D	CONJ	Konjugat, (Maus-anti-human-Hb, peroxidasemarkiert), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7817D	STD	Standards, lyophilisiert (50; 10; 3,3; 0,67; 0 µg/g)	4 x 5 vials
K 7817D	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7817D	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 7817D	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7817D	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z.B. Artikel-Nr. K 6998SAS
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* 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).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben 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.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich

bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml *IDK Extract®* + 150 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. Das *IDK Extract®* kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract®*) ist bei **2–8°C vier Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Stuhlprobenextraktion

Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract®*) wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlprobenaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

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

SAS mit 1,5 ml Extraktionspuffer:

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 Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract®*) **befüllen**. **Wichtig:** Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- 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 vortexen 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 Suspendierung 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 Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim 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 wird die Probe an die in der Arbeitsliste definierte Position im Samplerack gestellt.

Lagerung der Proben

Wegen des Abbaus von Hämoglobin/Haptoglobin bei Raumtemperatur, der bis zu 50 % pro Tag ausmachen kann, sollte der Transport des **Rohstuhls** nach Möglichkeit gefroren erfolgen. Ist der Transport weder bei -20 °C noch gekühlt möglich, können die Proben mit Postversand über Nacht geschickt werden, wodurch man jedoch an Sensitivität verliert. Der Rohstuhl kann 1 Monat bei -20 °C gelagert werden.

Stuhlextrakt ist bei Raumtemperatur (15–30 °C), 2–8 °C sowie bei -20 °C sieben Tage haltbar. Die Extrakte sollten maximal drei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung des humanen Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes im Stuhl. Proben und Standards werden in die mit anti-Haptoglobin-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. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automatenpezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	50 µl Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) in jede Vertiefung vorlegen.
3.	50 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
4.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.

5.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6.	100 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
7.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
8.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
10.	10–20 min* bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
11.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
12.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Stuhlproben

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

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × anzuwendender Probenverdünnungsfaktor

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

Referenzwerte

Hämoglobin-Haptoglobin-Konzentration (Stuhl)*: **< 2 µg/ml $\triangleq$ < 2 µg/g**
(1 g Stuhl $\triangleq$ 1 ml)

* H.G. Bischoff et al., 1990. Okkultes Blut im Stuhl: Empfindlicher und spezifischer Nachweis durch immunologische Bestimmung von Human-Albumin und -Hämoglobin. *Ärztl. Lab.*, **36**. pp. 101–112.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,054 µg/ml.

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 42)

Probe	Hämoglobin-Haptoglobin [µg/g]	VK [%]
1	3,88	2,49
2	8,31	3,89

Inter-Assay (n = 30)

Probe	Hämoglobin-Haptoglobin [µg/g]	VK [%]
1	1,16	4,29
2	4,2	2,64

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.

- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt 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 Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.

- IDK® und IDK Extract® sind Marken der Immundiagnostik AG.
- 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.

15. LITERATUR

Allgemeine Literatur

1. Lüthgens, K. et al., 1998. Hemoglobin-Haptoglobin-Complex: A Highly Sensitive Assay for the Detection of Fecal Occult Blood. *Clinical laboratory*, **44**, pp.543–551.
2. Thomas, L., 1998. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik **5th ed.**, Frankfurt/Main: *TH-Books Verlagsgesellschaft*.
3. John, M. et al., 1994. Nachweis von Albumin im Stuhl zur Erkennung okkultur Blutungen : Vergleich zweier immunologischer Tests . Radiale Immundiffusion vs BM-Test Colon Albumin. *Klinisches Labor*, **40**, pp.77–81.

Publikationen mit dem IDK® Hb-Hp-Komplex ELISA

4. Chalkias, A. et al., 2011. Patients with colorectal cancer are characterized by increased concentration of fecal hb-hp complex, myeloperoxidase, and secretory IgA. *American journal of clinical oncology*, **34**(6), pp.561–6.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



In-Vitro-Diagnostikum



Hersteller



Chargenbezeichnung



Achtung



Bestellnummer



Zu verwenden mit



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Verwendbar bis



Gebrauchsanweisung beachten

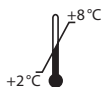
IDK[®] Hb/Hp complex ELISA

***For the in vitro determination of hemoglobin/haptoglobin
in stool***

Valid from 2018-06-21



K 7817D



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE _____ 15

2. INTRODUCTION _____ 15

3. MATERIAL SUPPLIED _____ 15

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED _____ 16

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS _____ 16

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES _____ 17

Extraction of the stool samples _____ 17

Sample stability and storage _____ 18

7. ASSAY PROCEDURE _____ 18

Principle of the test _____ 18

Test procedure _____ 19

8. RESULTS _____ 20

9. LIMITATIONS _____ 21

10. QUALITY CONTROL _____ 21

Reference range _____ 21

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS _____ 21

Analytical Sensitivity _____ 21

Precision and reproducibility _____ 22

12. PRECAUTIONS _____ 22

13. TECHNICAL HINTS _____ 22

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE _____ 23

15. REFERENCES _____ 23

General literature _____ 23

Literature using the IDK® Hb/Hp complex ELISA _____ 24

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of human **hemoglobin/haptoglobin complex** in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

In contrast to commercially available rapid tests, this hemoglobin/haptoglobin complex ELISA does not require previous adherence to a diet (no raw meat etc.) and recognises human hemoglobin/haptoglobin complex in 100-fold lower concentrations. This avoids false-negative results. Because of the antibodies used, 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. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7817D	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 7817D	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 7817D	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract®</i> , 2.5 x	1 x 100 ml
K 7817D	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2 x 15 ml
K 7817D	CONJ	Conjugate, (mouse-anti humanHb, peroxidase-labelled), ready-to-use	1 x 15 ml
K 7817D	STD	Standards, lyophilised (50; 10; 3,3; 0,67; 0 µg/g)	4 x 5 vials
K 7817D	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vials
K 7817D	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7817D	SUB	Substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 7817D	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Stool sample application system such as Cat. No.: K 6998SAS
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* 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).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate IDK Extract®** has to be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml IDK Extract® + 150 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to

high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals have to be redissolved at 37°C in a water bath. The **IDK Extract®** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Extraction buffer (1:2.5 diluted **IDK Extract®**) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for four months**.

- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of ultra pure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Extraction of the stool samples

Extraction buffer (1:2.5 diluted **IDK Extract®**) is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

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

Stool sample tube – Instructions for use

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

SAS with 1.5 ml extraction 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 particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty stool sample tube** with **1.5 ml extraction buffer** (1:2.5 diluted **IDK Extract®**) 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 the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has 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, leaving 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 ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

The sample suspension is now ready for use.

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

Sample stability and storage

Due to the degradation of hemoglobin/haptoglobin at room temperature, which can amount to 50% per day, **raw stool** samples should be shipped frozen. If shipment either at -20 °C or cooled is not possible, the samples can be mailed overnight, but this will reduce the sensitivity. Raw stool can be stored at -20 °C for 1 month.

Stool extract is stable at room temperature (15–30 °C), at 2–8 °C as well as at -20 °C for seven days. Avoid more than three freeze-thaw cycles.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of hemoglobin/haptoglobin complex in stool. The complex in the sample is bound to anti-haptoglobin antibodies (in excess), which are immobilised 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 labelled 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 colour converts from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of hemoglobin/haptoglobin complex in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using the values obtained from standard. Hemoglobin/haptoglobin complex, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add 50 µl of sample dilution buffer (SAMPLEBUF) into each well.
3.	Add each 50 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells.
4.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C).
5.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
6.	Add 100 µl conjugate (CONJ) into each well.
7.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C).
8.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
9.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.

10.	Incubate for 10–20 min* at room temperature (15–30 °C) in the dark .
11.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
12.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the „4 parameter algorithm“.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Stool

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

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

Analytical sensitivity × sample dilution factor to be used

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed 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.

Reference range

Hemoglobin/haptoglobin (stool)*: **$< 2 \mu\text{g/ml} \triangleq < 2 \mu\text{g/g}$**
(1 g stool $\triangleq$ 1 ml)

* H.G. Bischoff et al., 1990. Fecal Occult Blood: A Sensitive and Specific Method for Detection by Immunological Determination of Human Albumin and Hemoglobin. *Ärztl. Lab.*, **36**, pp. 101–112.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$. The zero-standard was measured 20 times. A detection limit of $0.054 \mu\text{g/ml}$ was obtained.

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 42)

Sample	Hemoglobin/ Haptoglobin [µg/g]	CV [%]
1	3.88	2.49
2	8.31	3.89

Inter-Assay (n = 30)

Sample	Hemoglobin/ Haptoglobin [µg/g]	CV [%]
1	1.16	4.29
2	4.2	2.64

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are 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 Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.

- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- IDK® and IDK Extract® are trademarks of Immundiagnostik AG.
- 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

General literature

1. Lüthgens, K. et al., 1998. Hemoglobin-Haptoglobin-Complex: A Highly Sensitive Assay for the Detection of Fecal Occult Blood. *Clinical laboratory*, **44**, pp.543–551.
2. Thomas, L., 1998. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik **5th ed.**, Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft.
3. John, M. et al., 1994. Nachweis von Albumin im Stuhl zur Erkennung okkultur Blutungen : Vergleich zweier immunologischer Tests . Radiale Immundiffusion vs BM-Test Colon Albumin. *Klinisches Labor*, **40**, pp.77–81.

Literature using the IDK® Hb/Hp complex ELISA

4. Chalkias, A. et al., 2011. Patients with colorectal cancer are characterized by increased concentration of fecal hb-hp complex, myeloperoxidase, and secretory IgA. *American journal of clinical oncology*, **34**(6), pp.561–6.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use