

IDK[®] Hämoglobin ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von Hämoglobin in Stuhl

IDK[®] Hemoglobin ELISA

For the in vitro determination of hemoglobin in stool

Mit IDK Extract[®] **7 Tage Stabilität**
bei Raumtemperatur*
Stable for 7 days at room tempera-
ture* if used with IDK Extract[®]



* gemäß Anforderungen des G-BA-Beschlusses vom 21.04.2016

* in accordance with provisions by the G-BA (Joint German Federal Health Board) issued 21.04.2016

Gültig ab / Valid from 2018-05-17

REF **K 7816D**

Σ 96

REF **K 7816D.20**

Σ 20 x 96



IVD

CE



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>Probenstabilität und -lagerung</i>	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	9
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	9
<i>Klinische Sensitivität und Spezifität</i>	10
<i>Linearität</i>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Analytische Spezifität</i>	12
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
13. TECHNISCHE MERKMALE	13
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13
15. LITERATUR	14
<i>Allgemeine Literatur</i>	14
<i>Publikationen mit dem IDK® Hämoglobin-ELISA</i>	14

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Immunassay eignet sich für die Bestimmung von Hämoglobin in Stuhl, z. B. im Rahmen eines Darmkrebscreenings. Nur zur *in-vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Der Nachweis von Hämoglobin in Stuhl kann als Marker für gastrointestinale Blutungen für die Darmkrebsvorsorge verwendet werden. Blut in Stuhl kann unter anderem von Tumoren oder Polypen im Darm stammen. Wenn Hämoglobin nachgewiesen wurde, muss durch eine Darmspiegelung abgeklärt werden, ob die Blutung tatsächlich von einem Tumor oder einer Vorstufe stammt. In Kombination mit der Darmspiegelung kann der Immuntest nachweislich das Risiko verringern, an Darmkrebs zu sterben.

Gegenüber guajakbasierten Tests ist der Vorteil des *IDK*[®] Hämoglobin ELISAs, dass er sensitiv und spezifisch ausschließlich humanes Hämoglobin nachweist. Vor der Stuhlprobennahme für den *IDK*[®] Hämoglobin ELISA muss keine spezielle Diät eingehalten werden, da weder der Verzehr von rohem Fleisch, Radieschen, Rettichen oder Vitamin-C-haltigen Lebensmitteln einen Einfluss auf das Testergebnis haben.

Indikationen:

- Nachweis von okkultem Blut im Stuhl
- Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa
- Verdacht auf Kolonkarzinom
- Polypen im Kolorektum

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge für Art.-Nr.	
		K 7816D	K 7816D.20
PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12x 8 Vertiefungen	20x 12x 8 Vertiefungen
WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2x 100 ml	40x 100 ml
IDK Extract [®]	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract</i> [®] , 2,5x	1x 100 ml	–
SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2x 15 ml	3x 100 ml

CONJ	Konjugat, (Maus-anti-human-Hb, peroxidasemarkiert), gebrauchsfertig	1 x 15 ml	20 x 15 ml
STD	Standards, lyophilisiert (50; 10; 3.3; 0.67; 0 µg/g)	2 x 5 vials	25 x 5 vials
CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 vials	25 vials
CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 vials	25 vials
SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml	20 x 15 ml
STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml	20 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
- 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 > 0,2µm) 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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an-zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASH-BUF + 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 des hohen Salzgehalts im Konzentrat 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 **4 Monate bei 2–8 °C** 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, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (re-konstituierte STD und CTRL) **können 4 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Probenstabilität und -lagerung

Wegen des Abbaus von Hämoglobin 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 7 Tage haltbar. Die Extrakte sollten maximal drei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.

* gemäß Anforderungen des G-BA-Beschlusses vom 21.04.2016

Stuhlprobenextraktion

Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlaufbereitungssystem (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 Puffer:

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

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

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- 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!
- 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.
- 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.
- Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- 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 Sedi-

ment 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.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der vorliegende ELISA dient zur quantitativen Erfassung des humanen Hämoglobins im Stuhl. Proben und Standards werden in die mit anti-Hämoglobin-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterwells gegeben. Nach einer Inkubation werden nicht-gebundene Komponenten durch einen Waschschrift entfernt. Das gebundene Antigen wird mittels eines Antikörper-POD/TMB-Systems nachgewiesen. Die Quantifizierung erfolgt durch Bestimmung der Extinktion bei 450 nm. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

Eingefrorene Stuhlprobenextrakte auf Raumtemperatur (15–30°C) bringen und dann vortexen. Danach wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen und anschließend nur der Überstand verwendet.

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 automaten-spezifische 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 vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen . Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen. |
|----|--|

2.	50 µl Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) in jede Vertiefung vorlegen.
3.	50 µl Standards/Kontrollen/Überstand in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
4.	1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
5.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
6.	100 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
7.	1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
8.	Den Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
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.
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 Farbschlag 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) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs 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*

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

Basierend auf der Studie von Gies *et al.* [6] mit 516 Stuhlproben wurde für das Darmkrebscreening ein Cut-Off von 10 µg/g Stuhl ermittelt.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=42

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [µg/g]	VK [%]
1	7,00	2,6
2	3,99	4,8

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=68

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Kontrollproben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [µg/g]	VK [%]
1	0,87	8,6
2	3,51	4,8

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an.

3 Stuhlproben wurden dafür mit bekannten Hämoglobin-Konzentrationen versetzt und gemessen.

Probe	Spike [µg/g]	Gemessen [µg/g]	Erwartet [µg/g]	Wiederfindung [%]
A	ungespiked	19,23	–	–
	1,53	20,96	20,76	100,96
	3,06	22,74	22,29	102,02
	7,65	27,67	26,88	102,94
	15,30	34,35	34,53	99,47
B	ungespiked	11,03	–	–
	1,53	12,18	12,56	96,93
	3,06	13,36	14,09	94,76
	7,65	17,77	18,69	95,11
	15,30	24,64	26,34	93,57
C	ungespiked	1,42	–	–
	1,53	2,76	2,95	93,55
	3,06	4,47	4,48	99,83
	7,65	9,54	9,07	105,16
	15,30	17,44	16,72	104,27

Klinische Sensitivität und Spezifität

Bei einem Grenzwert von 10 µg Hämoglobin/g Stuhl hat der *IDK*[®] Hämoglobin ELISA basierend auf den Daten der Studie von Gies et al. [6] eine klinische Spezifität von 95,0% und eine klinische Sensitivität von 27,3% für fortgeschrittene Neoplasien (kolorektale Karzinome und große Adenome). Die mit diesem Grenzwert erwartete Positivrate für Proben im organisierten Darmkrebscreening (= untersuchte repräsentative Auswahl gesammelter Stuhlproben) beträgt 8,1%.

Bei einem Grenzwert von 2 µg Hämoglobin/g Stuhl hat der *IDK*[®] Hämoglobin ELISA in der Studie von Hoepffner et al [5] eine höchste klinische Sensitivität von 63,8% für kolorektale Karzinome und große Adenome. Diese Sensitivität ist verbunden mit einer klinischen Spezifität von 96,3%.

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer serieller Verdünnung von 4 Stuhlproben nachgewiesen. In der nachfolgenden Tabelle sind 2 Proben beispielhaft dargestellt.

Für Hämoglobin in Stuhl wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 0,44 bis 23,75 µg/g nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als ± 20%.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	unverdünnt	23,75	23,75	-
	1:2	11,87	13,83	116,49
	1:4	5,94	6,74	113,61
	1:8	2,97	3,52	118,49
	1:16	1,48	1,61	108,42
	1:32	0,74	0,68	91,37
	1:64	0,37	0,30	80,32
B	unverdünnt	16,56	16,56	-
	1:2	8,28	7,48	90,31
	1:4	4,14	3,95	95,31
	1:8	2,07	1,80	87,05
	1:16	1,04	0,91	87,44
	1:32	0,52	0,44	84,44

Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (limit of blank, LoB)	0,086 µg/g
Nachweisgrenze (limit of detection, LoD)	0,152 µg/g
Bestimmungsgrenze (limit of quantitation, LoQ)	0,177 µg/g

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu 6 strukturell ähnlichen Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration	Gefundene Konzentration [µg/g]	Fazit
Pankreatische Amylase	2800 mU/l	0,026	< LoB
Myeloperoxidase	315,5 ng/ml	0,038	< LoB
Lysozym	30 ng/ml	0,021	< LoB
Chymotrypsin	1000 ng/ml	0,028	< LoB
slgA	600 ng/ml	0,023	< LoB
Albumin	6250 ng/ml	0,001	< LoB

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.

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 okkulterer Blutungen : Vergleich zweier immunologischer Tests . Radiale Immundiffusion vs BM-Test Colon Albumin. *Klinisches Labor*, **40**, pp.77–81.

Publikationen mit dem IDK® Hämoglobin-ELISA

4. Trojan, J. et al., 2002. A new immunological test strip device for the rapid, qualitative detection of faecal occult blood. *Zeitschrift für Gastroenterologie / German Journal of Gastroenterology*, **40**, pp.921–924.
5. Hoepffner, N. et al., 2006. Comparative evaluation of a new bedside faecal occult blood test in a prospective multicentre study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **23**(1), pp.145–54.
6. Gies, A. et al., 2017. Direct Comparison of Diagnostic Performance of 9 Quantitative Fecal Immunochemical Tests for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology*. epub ahead of print

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten

IDK[®] Hemoglobin ELISA

For the in vitro determination of hemoglobin in stool

Valid from 2018-05-17

REF K 7816D

Σ 96

REF K 7816D.20

Σ 20 x 96



IVD



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	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL SUPPLIED	19
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	20
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	21
<i>Sample stability and storage</i>	21
<i>Extraction of the stool samples</i>	21
7. ASSAY PROCEDURE	23
<i>Principle of the test</i>	23
<i>Test procedure</i>	23
8. RESULTS	24
9. LIMITATIONS	25
10. QUALITY CONTROL	25
<i>Reference range</i>	26
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	26
<i>Accuracy – Precision</i>	26
<i>Clinical sensitivity and specificity</i>	26
<i>Accuracy – Trueness</i>	27
<i>Analytical sensitivity</i>	27
<i>Linearity</i>	28
<i>Analytical specificity</i>	28
12. PRECAUTIONS	29
13. TECHNICAL HINTS	29
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	30
15. REFERENCES	30
<i>General literature</i>	30
<i>Literature using the IDK® hemoglobin ELISA</i>	30

1. INTENDED USE

This immunoassay is intended for the quantitative determination of human haemoglobin in stool, e.g. for colorectal cancer screening. For *in-vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

In colon cancer prevention, the detection of haemoglobin in stool can be used as marker for gastrointestinal bleedings. Tumours and polyps are a possible source of blood in stool. After the detection of haemoglobin, a colonoscopy has to be performed to clarify if the blood comes indeed from a tumour or a tumour precursor. In combination with colonoscopy, the hemoglobin stool immunoassay is proven to be able to reduce the risk of mortality due to colon cancer.

The advantage of the *IDK*[®] hemoglobin ELISA over guaiac-based tests is its sensitive and specific detection of exclusively human hemoglobin. It is not necessary to follow a special diet before drawing a stool sample for the *IDK*[®] hemoglobin ELISA, as neither raw meat, radish, nor food containing vitamin C have an influence on the test result.

Indications

- Detection of occult blood in stool
- Crohn´s disease; Ulcerative Colitis
- Suspicion of colon carcinoma
- Polyps in the colon

3. MATERIAL SUPPLIED

Label	Kit components	Quantity for cat. no.	
		K 7816D	K 7816D.20
PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12x 8 wells	20x 12x 8 wells
WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2x 100 ml	40x 100 ml
IDK Extract [®]	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract</i> [®] , 2.5x	1x 100 ml	–
SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	2x 15 ml	3x 100 ml
CONJ	Conjugate, (mouse-anti humanHb, peroxidase-labelled), ready-to-use	1x 15 ml	20x 15 ml

STD	Standards, lyophilised (50; 10; 3.3; 0.67; 0 µg/g)	2 x 5 vials	25 x 5 vials
CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	1 x 2 vials	25 vials
CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	1 x 2 vials	25 vials
SUB	Substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml	20x 15 ml
STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml	20x 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
- 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.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **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 con-

centration 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 **for 1 month at 2–8°C**.

- **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 concentrate. 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 **for 4 months at 2–8°C**.
- 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**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly to ensure complete reconstitution. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at 2–8°C for 4 weeks**.
- 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

Sample stability and storage

Due to the degradation of hemoglobin 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), 2–8°C as well as at -20°C for 7 days. Avoid more than three freeze-thaw cycles.

* under the requirements of the G-BA-Beschluss of 21.04.2016

Extraction of the stool samples

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 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.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is used for quantitative determination of hemoglobin in stool. The hemoglobin in the sample is bound to anti-hemoglobin antibodies (in excess), which are 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. 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 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, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

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

Bring **frozen sample suspensions to room temperature** (15–30°C) and then vortex. Allow the sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled before using the supernatant in the test.

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

Take as many microtiter strips as needed from the 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.	Wash the pre-coated microtiter plate 5 x with 250 µl wash buffer before use . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add 50 µl sample dilution buffer (SAMPLEBUF) into each well.
3.	Add each 50 µl standards/controls/supernatant into the respective wells.
4.	Incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C).

5.	Discard the contents 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.	Incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C).
8.	Discard the contents 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 minutes 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 calibrator 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 with the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

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

Samples with concentrations lower than the measurement range 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

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

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

Based on a study from Gies *et al.* of 516 stool samples, the cut-off value was estimated to be 10 µg/g for colorectal cancer screening.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n=42

The repeatability was assessed with 2 stool samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [µg/g]	CV [%]
1	7.00	2.6
2	3.99	4.8

Reproducibility (Inter-Assay); n=68

The reproducibility was assessed with 2 stool samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [µg/g]	CV [%]
1	0.87	8.6
2	3.51	4.8

Clinical sensitivity and specificity

Based on a study of Gies *et al.* [6], the *IDK*[®] hemoglobin ELISA results in a clinical specificity of 95.0% and a clinical sensitivity of 27.3% for advanced neoplasms (colorectal cancer [CRC] and large adenoma) with a cut-off of 10 µg hemoglobin/g stool. The expected positivity rate for corresponding samples in an organised colorectal cancer screening is 8.1% as calculated from a collection of representative stool samples.

In a study of Hoepffner *et al.* [5], a cut-off value of 2.0 µg hemoglobin/g stool for the *IDK*[®] Hemoglobin ELISA resulted in a highest clinical sensitivity of 63.8% for CRC and large adenoma. The respective clinical specificity was 96.3%.

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, hemoglobin-spikes with known concentrations were added to 3 different stool samples.

Sample	Spike [µg/g]	Obtained [µg/g]	Expected [µg/g]	Recovery [%]
A	unspiked	19.23	–	–
	1.53	20.96	20.76	100.96
	3.06	22.74	22.29	102.02
	7.65	27.67	26.88	102.94
	15.30	34.35	34.53	99.47
B	unspiked	11.03	–	–
	1.53	12.18	12.56	96.93
	3.06	13.36	14.09	94.76
	7.65	17.77	18.69	95.11
	15.30	24.64	26.34	93.57
C	unspiked	1.42	–	–
	1.53	2.76	2.95	93.55
	3.06	4.47	4.48	99.83
	7.65	9.54	9.07	105.16
	15.30	17.44	16.72	104.27

Analytical sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard without considering possibly used sample dilution factors

Limit of blank, LoB	0.086 µg/g
Limit of detection, LoD	0.152 µg/g
Limit of quantitation, LoQ	0.177 µg/g

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP6-A by serial dilution of 4 different stool samples. In the table below, the dilution of 2 exemplary samples is shown.

For hemoglobin in stool, the method has been demonstrated to be linear from 0.44 to 23.75 µg/g, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [µg/g]	Obtained [µg/g]	Recovery [%]
A	undiluted	23.75	23.75	–
	1:2	11.87	13.83	116.49
	1:4	5.94	6.74	113.61
	1:8	2.97	3.52	118.49
	1:16	1.48	1.61	108.42
	1:32	0.74	0.68	91.37
	1:64	0.37	0.30	80.32
B	undiluted	16.56	16.56	–
	1:2	8.28	7.48	90.31
	1:4	4.14	3.95	95.31
	1:8	2.07	1.80	87.05
	1:16	1.04	0.91	87.44
	1:32	0.52	0.44	84.44

Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against 6 compounds with structural similarity to hemoglobin. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Concentration added	Concentration obtained [µg/g]	Conclusion
Pankreatic amylase	2800 mU/l	0.026	< LoB
Myeloperoxidase	315.5 ng/ml	0.038	< LoB
Lysozyme	30 ng/ml	0.021	< LoB
Chymotrypsin	1000 ng/ml	0.028	< LoB

Substance tested	Concentration added	Concentration obtained [$\mu\text{g/g}$]	Conclusion
slgA	600 ng/ml	0.023	< LoB
Albumin	6250 ng/ml	0.001	< LoB

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 the 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[®] hemoglobin ELISA

4. Trojan, J. et al., 2002. A new immunological test strip device for the rapid, qualitative detection of faecal occult blood. *Zeitschrift für Gastroenterologie / German Journal of Gastroenterology*, **40**, pp.921–924.
5. Hoepffner, N. et al., 2006. Comparative evaluation of a new bedside faecal occult blood test in a prospective multicentre study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **23**(1), pp.145–54.

6. Gies, A. et al., 2017. Direct Comparison of Diagnostic Performance of 9 Quantitative Fecal Immunochemical Tests for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology*. epub ahead of print

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