

**INTENDED USE**

The CerTest FOB-Transferrin is a one step coloured chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human hemoglobin (Hb) and human transferrin (Tf) in stool samples to detect gastrointestinal bleeding.

**INTRODUCTION**

Colorectal cancer is a leading cause of illness and death in the Western world. Screening with fecal occult blood tests is based on the concept that important target colonic neoplasm, such as early-stage cancer and large adenomatous polyps, will bleed, for which may be detected by an occult blood test. When gastrointestinal blood is lost, the stool will contain a combination of intact or nearly intact hemoglobin, intact heme, and heme-derived porphyrins in amounts that depend on the site, the amount of bleeding and the transit time through the gut. Immunochemical tests detect intact or nearly intact human hemoglobin, being a very specific technique to detect the loss of blood from the lower intestine, because blood from lower sites is less degraded during transit. The hemoglobin is unstable in feces, leading to false negative results. The detection of fecal transferrin, which is more stable than hemoglobin, provides an alternative way of diagnosing the disease in the upper digestive tract. Transferrin is a blood-derived component that may be leaked into gastrointestinal tract and then discharged with the feces in gastrointestinal bleeding diseases. Transferrin is stable in feces and a good marker to detect loss of blood from the upper and lower intestine (gastrointestinal bleeding). This immunochromatographic assay detects human hemoglobin and human transferrin in stool samples simultaneously, by obtaining more accurate testing results.

**PRINCIPLE OF THE TEST**

The CerTest FOB-Transferrin is a qualitative immunochromatographic assay for the determination of human hemoglobin and human transferrin in stool samples. The membrane is pre-coated with mouse monoclonal antibodies on both test bands (result region), against human hemoglobin and human transferrin.

During testing, the sample is allowed to react with the coloured conjugates (anti-human hemoglobin antibodies-blue microspheres and anti-human transferrin antibodies-red microspheres) pre-dried on the test. The mixture then moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the coloured particles migrate. In the case of a positive result the specific antibodies present on the membrane will capture the coloured conjugate. Different coloured bands will be visible, depending upon the hemoglobin or the transferrin content of the sample. These bands are used to interpret the result.

The mixture continues to move across the membrane to the immobilized antibody placed in the control band region, a green coloured band always appears. The presence of this green band serves as 1) verification that sufficient volume is added, 2) proper flow obtained and 3) an internal control for the reagents.

**STORAGE AND STABILITY**

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable through the expiration date printed on the sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

**PRECAUTIONS**

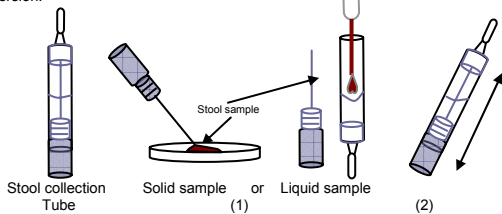
- For professional *in vitro* diagnostic use only.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered as potentially hazardous and handled as if they were infectious agents.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.

**SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

Stool samples should be collected in clean containers and the assay should be done right after collection. The samples can be stored in the refrigerator (2-4°C) for 1-2 days prior to testing. For longer storage, maximum 1 year, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed, and brought to room temperature before testing.

**Specimen preparation (see illustration):**

- (1) Unscrew the tap and use the stick by introducing four times into the fecal specimen to pick up a little sample (approx. 150mg), if the stool sample were liquid take 150 µL by using a pipette and adding the sample into the stool collection tube.
- (2) Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion.



**Precautions:** Patients suffering from menstrual period, bleeding haemorrhoids, blood in urine or strain during bowel movement should not collect samples.

**MATERIALS PROVIDED**

- Device tests
- Instructions for use
- Stool collection tubes-sample diluent

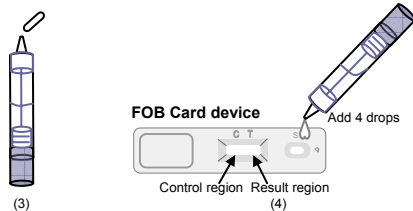
**MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED**

- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

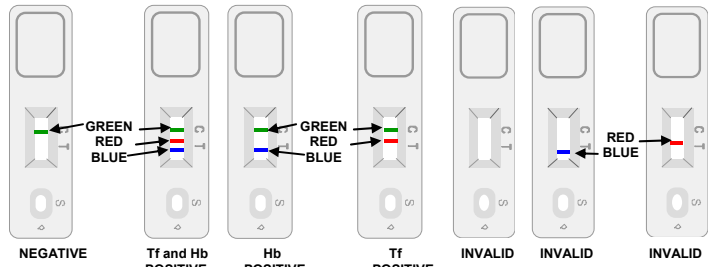
**TEST PROCEDURE**

**Allow the test, stool samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until ready to perform the assay.**

1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion. Cut the end of the top (3).
2. Remove the CerTest FOB-Transferrin card device from its sealed bag just before using.
3. Use a separate stool collection tube and device for each sample or control. Dispense 4 drops or 100 µL into the circular window marked with the arrow (4).
4. Read the result at **10 minutes** (the coloured bands appear). Do not read the test result after more than 10 minutes.



**INTERPRETATION OF RESULTS (PLEASE REFER TO THE ILLUSTRATION BELOW)**



**NEGATIVE:** Only one GREEN band appears across the central window in the site marked with the letter C (control line). No occult blood presents: neither human haemoglobin nor human transferrin.

**Tf and Hb POSITIVE:** In addition to the GREEN control band, a RED band (Tf test line) and a BLUE one (Hb test line) also appear in the site marked with the letter T (result region). That probably would mean a lower gastrointestinal bleeding disease (colorectal cancer).

**Tf POSITIVE:** In addition to the GREEN control band, a RED band (Tf test line) also appears in the site marked with the letter T (result region). That probably would mean an upper gastrointestinal bleeding disease (the human haemoglobin was probably degraded in the gastrointestinal tract).

**Hb POSITIVE:** In addition to the GREEN control band, a BLUE band (Hb test line) also appears in the site marked with the letter T (result region). That probably would mean a lower gastrointestinal bleeding disease (the concentration of human transferrin in blood is 100 times less than human haemoglobin, therefore, Hb positive means not much blood present in feces).

**INVALID:** A total absence of the control coloured band (GREEN) regardless the appearance or not of the result lines (RED or BLUE). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are likely the reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the tests using a new test. If the problem persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

**NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS**

The intensity of the RED/BLUE coloured band in the result region (T) will vary depending on the concentration of human hemoglobin or human transferrin in the specimen. However, neither the quantitative value, nor the rate of increase in hemoglobin or transferrin can be determined by this qualitative test.

**QUALITY CONTROL**

Internal procedural controls are included in the test. A GREEN line appearing in the control region (C) is an internal control. It confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique.

**LIMITATIONS**

1. The test must be carried out within 2 hours of opening the sealed bag.
2. An excess of stool sample could result in wrong results (brown bands appear or absence of the control coloured band).
3. Patients suffering from menstrual period, bleeding hemorrhoids, blood in urine or strain during bowel movement should not collect samples.
4. Positive results confirm the presence of human hemoglobin or/and human transferrin in fecal samples; nevertheless, it can be also due to several causes besides colorectal bleeding, such as hemorrhoids, blood in urine or stomach irritations. A positive result should be followed up with additional diagnostic procedures to determine the exact cause and source of the blood in the stool.
5. Negative results do not exclude bleeding, as some polyps and colorectal cancers may bleed intermittently or not during certain stages of the disease. Moreover, blood may not be uniformly distributed in stool samples.

**PERFORMANCE**

**Sensitivity**

A sample containing human hemoglobin at concentration equal to or higher than 30 ng/mL and human transferrin at concentration equal to or higher than 4 ng/mL produces positive results when using CerTest FOB-Transferrin test.

Different hemoglobin and transferrin dilutions were tested directly in the extraction buffer or spiked in a negative stool sample in accordance with the kit instructions to determine the detection limit of the test.

The detection of human hemoglobin with CerTest FOB-Transferrin test showed >99% of sensitivity compared to a commercial guaiac assay.

The detection of human hemoglobin in stool samples with CerTest FOB-Transferrin test showed >99 % of sensitivity compared with others commercial rapid tests (ImmunoTech OccuTech (YD Diagnostics) and Human Hexagon OBTI).

**Specificity**

The CerTest FOB-Transferrin test is specific for human hemoglobin and human transferrin, showing no cross-reaction with hemoglobin or transferrin from bovine and pig.

The detection of human haemoglobin with CerTest FOB-Transferrin Test showed >99% of specificity compared to a commercial guaiac assay, >99% compared with other commercial rapid tests (ImmunoTech OccuTech (YD Diagnostics) and Human Hexagon OBTI).

The use of mouse monoclonal antibodies in the elaboration of CerTest FOB-Transferrin test assures high degree of specificity to detect human haemoglobin and transferrin.

**REFERENCES**

1. Towler BP, Irwig L, Glasziou P, Weller D, Kewenter J. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult. Cochrane Database Syst Rev. 2000;(2): CD001216.
2. Ransohoff DF and Lang CA. Screening for colorectal cancer with the Fecal Occult Blood Test: a background paper. Ann Intern Med. 1997; 126: 811-822.
3. Ransohoff DF and Lang CA. Suggested technique for Faecal Occult Blood testing and interpretation in colorectal cancer screening. Ann Intern Med. 1997; 126: 808-810.
4. Chien-Hua Chiang et al., "A Comparative Study of Three Fecal Occult Blood Test in Upper Gastrointestinal Bleeding". Kaohsiung J. Med. Sci. May 2006, 22; 223-228.
5. Virtanen et al., "Higher concentrations of serum transferrin receptor in children than in adults", Am. J. Clin. Nutr. 1999; 69: 256-60.

**SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS**

	<i>In vitro</i> diagnostic device		Lot code
	Consult instructions for use		Catalogue number
	Keep dry		Contains sufficient for <n> tests
	Temperature limitation		Manufacturer
	Use by		Do not use if package damaged



**CerTest**  
BIOTEC S.L.  
María de Luna 11  
E-50018 Zaragoza (SPAIN)  
www.certest.es





**CERTEST FOB-TRANSFERRIN**  
**Prueba de un solo paso en cassette para la detección de hemoglobina y/o transferrina humana en heces**

**USO PREVISTO**

CerTest FOB-Transferrin es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la determinación cualitativa de hemoglobina humana (Hb) y transferrina humana (Tf) en heces para detectar sangrados gastrointestinales.

**INTRODUCCIÓN**

El cáncer colo-rectal es la principal causa de enfermedad y muerte en el mundo occidental. Los tests de sangre oculta en heces se utilizan principalmente para diagnosticar neoplasmas colónicos, como el cáncer en su fase inicial y algunos pólipos adenomatosos, que sangran y pueden detectarse por este tipo de test. Cuando se elimina sangre gastrointestinal, las heces contienen una mezcla de hemoglobina no degradada o poco degradada, grupos hemo, y porfirina hemo-derivada en cantidades que dependen del lugar, de la cantidad de sangrado y del tiempo de tránsito a través del intestino. Los tests inmunocromatográficos detectan hemoglobina humana no degradada o casi intacta, siendo una técnica muy específica para detectar pérdidas de sangre producidas en la parte final del intestino, ya que la sangre procedente de este lugar sufre menor degradación durante su tránsito. La hemoglobina es inestable en heces, provocando falsos negativos. La detección de transferrina "fecal", la cual es más estable que la hemoglobina, proporciona una forma alternativa para diagnosticar enfermedades localizadas en la parte alta del tracto digestivo.

La transferrina es un componente derivado de la sangre que puede llegar al tracto gastrointestinal, y eliminarse mediante las heces, provocado por algunas enfermedades gastrointestinales con pérdida de sangre. La transferrina es estable en las heces y es un buen marcador para detectar pérdidas de sangre en la zona alta y baja del intestino (en sangrado gastrointestinal).

Este test inmunocromatográfico detecta hemoglobina humana y transferrina en muestra de heces simultáneamente, obteniendo unos resultados más precisos.

**FUNDAMENTO DEL TEST**

CerTest FOB-Transferrin es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la determinación de hemoglobina humana y transferrina humana en muestras de heces. Previamente en la membrana se han fijado unos anticuerpos monoclonales, en la zona de las bandas del test, frente a hemoglobina humana y frente a transferrina humana.

Durante la prueba, la muestra reacciona con los conjugados coloreados (anticuerpos monoclonales anti-hemoglobina humana-microesferas azules y anticuerpos monoclonales anti-transferrina humana-microesferas rojas) previamente secados en el test. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana del test. Para dar el resultado como positivo, los anticuerpos específicos presentes en la membrana capturarán el conjugado coloreado correspondiente. Diferentes bandas coloreadas serán visibles dependiendo del contenido de hemoglobina o de transferrina en la muestra. Estas líneas o bandas se utilizarán para interpretar el resultado del test.

La mezcla de conjugados va avanzando por la membrana hasta la región de control donde se han inmovilizado anticuerpos y siempre aparecerá una línea de color VERDE (línea de control). La aparición de esta línea se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente y 2) que el flujo ha sido el apropiado; y 3) como control interno de los reactivos.

**CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30°C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

**PRECAUCIONES**

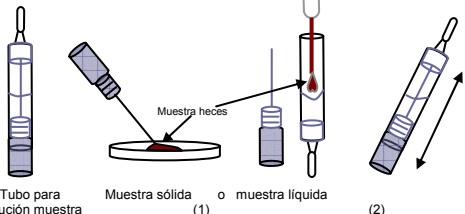
- Sólo para uso profesional in vitro.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).

**RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN**

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio y la prueba debe realizarse lo más pronto posible después de la recogida. Las muestras se deben conservar en frío (sólo 1 ó 2 días a 2-4° C) hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 1 año, deben mantenerse congeladas a -20° C. La muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba.

**Preparación de la muestra (ver dibujo):**

- (1) Desensrosar el tape y con ayuda del palito se toma una muestra de las heces recogidas. Para ello se introduce 4 veces el palito en la muestra recogiendo una pequeña cantidad de heces (aprox. 150mg), si la muestra fuera líquida se tomarán 150 µL de la misma con una pipeta, introducir la muestra en el tubo para dilución.
- (2) Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitar para facilitar la dispersión de la muestra.



**Precauciones:** No se deben obtener muestras de pacientes si tienen su periodo menstrual, si presentan hemorroides sangrantes, sangre en orina, o estreñimiento.

**MATERIALES SUMINISTRADOS**

- Dispositivos de reacción
- Instrucciones de uso
- Tubos de dilución de muestras-tampón de extracción

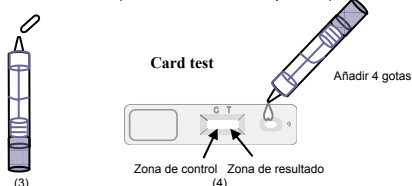
**MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS**

- Recipiente para la recogida de muestra de heces
- Guantes desechables
- Cronómetro

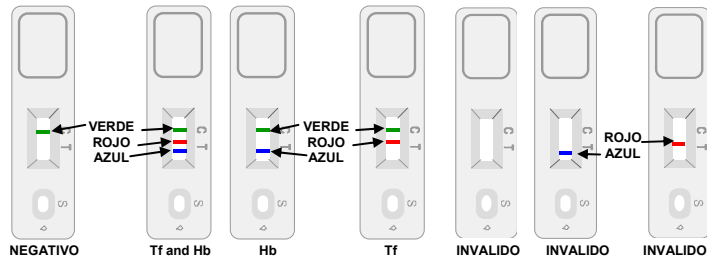
**PROCEDIMIENTO**

Previamente el dispositivo, las muestras de heces y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30° C). No abrir el envase hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el tubo de dilución de la muestra para asegurar una buena dispersión. Cortar la punta del tapón (3).
2. Sacar el dispositivo de reacción CerTest FOB-Transferrin de su envase para utilizarlo inmediatamente.
3. Para cada muestra o control se debe usar un tubo de dilución de la muestra y un dispositivo diferente. Tomar 4 gotas o 100 µL del líquido y depositarlas en la ventana circular marcada con una flecha o una S en el dispositivo (4).
4. Leer el resultado a los **10 minutos** (las líneas coloreadas aparecen). No leer el resultado pasados los 10 minutos.



**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**



**NEGATIVO:** Una sola línea de color VERDE aparece en la ventana central del dispositivo de reacción, en la zona marcada con la letra C (línea de control). No hay presencia de sangre oculta: ni hemoglobina humana, ni transferrina humana.

**Tf y Hb POSITIVO:** Además de la línea de control VERDE, también aparece una línea ROJA (línea del test de Tf) y una línea AZUL (línea del test de Hb) en la zona marcada con la letra T (zona de resultado). Lo que probablemente implique una enfermedad gastrointestinal con pérdida de sangre en la parte final del tracto (cáncer colorectal).

**Tf POSITIVO:** Además de la línea de control VERDE, aparece una línea ROJA (línea del test de Tf) en la zona marcada con la letra T (zona de resultados). Esto puede indicar una enfermedad gastrointestinal con pérdida de sangre en la zona superior del tracto (la hemoglobina humana probablemente se haya degradado durante su paso por el tracto gastrointestinal).

**Hb POSITIVO:** Además de la línea de control VERDE, aparece una línea AZUL (línea del test de Hb) en la zona marcada con la letra T (zona de resultados). Esto puede indicar una enfermedad gastrointestinal con pérdida de sangre en la zona final del tracto (la concentración de transferrina humana en sangre es 100 veces menos la hemoglobina humana, por lo que, Hb positivo implica que no hay mucha presencia de sangre en las heces).

**INVALIDO:** Cuando la línea de control (VERDE) no aparece independientemente de que aparezca o no la/s línea/s de resultado/s (ROJA/AZUL). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: una cantidad insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo dispositivo de reacción. Si persistiese el problema, debe contactar con su proveedor y dejar de utilizar la prueba.

**OBSERVACIONES**

La intensidad de la línea roja/azul en la zona de resultado puede variar dependiendo de la concentración de hemoglobina humana o de transferrina humana presente en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de hemoglobina o transferrina puede ser determinada por la misma.

**CONTROL DE CALIDAD**

El control interno de funcionamiento viene incluido en la prueba. La línea verde que aparece en la zona de control (C) es el control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

**LIMITACIONES**

1. Una vez abierto, el dispositivo no debe usarse después de 2 horas.
2. Un exceso de muestra de heces puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico, o ausencia de la línea de control.
3. No se deben obtener muestras de pacientes durante su periodo menstrual, si presentan hemorroides sangrantes, sangre en orina, o estreñimiento.
4. Los resultados positivos confirman la presencia de hemoglobina humana o/y transferrina humana en muestras de heces; sin embargo, ésta puede ser debida a varias causas, como hemorroides, sangre en orina, o irritaciones estomacales. Un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas para determinar la fuente y la causa de la presencia de sangre en la muestra de heces.
5. Los resultados negativos no excluyen las hemorragias causadas por algunos pólipos ni el cáncer colorectal, ya que pueden provocar hemorragias de forma intermitente o no provocadas durante alguna fase de la enfermedad. Además, la sangre podría no haberse distribuido de manera uniforme en la muestra de heces.

**CARACTERÍSTICAS DEL TEST**

**Sensibilidad**

Una muestra de heces que contenga una concentración de hemoglobina humana mayor o igual 30 ng/mL y de transferrina humana en concentración igual o mayor a 4ng/mL da un resultado positivo usando CerTest FOB-Transferrin test.

Diluciones diferentes de hemoglobina y transferrina fueron probadas directamente en el tampón de extracción o en muestras negativas de heces para determinar la sensibilidad y especificidad de CerTest FOB-Transferrin.

La detección de hemoglobina humana con el test CerTest FOB-Transferrin obtiene >99% de sensibilidad en comparación con un test comercializado de guaiaco.

La detección de hemoglobina humana con el test CerTest FOB-Transferrin obtiene >99% de sensibilidad en comparación con otros test rápidos comerciales (ImmunTech OcculTech (YD Diagnostics) y Human Hexagon OBTI).

**Especificidad**

CerTest FOB-Transferrin es específico para detectar hemoglobina humana y transferrina humana y no presenta ninguna reacción cruzada con hemoglobina bovina o porcina.

La detección de hemoglobina humana con CerTest FOB-Transferrin obtiene >99% de especificidad en comparación con un test comercializado de guanaco y >99% comparado con otros test rápidos del mercado (ImmunTech OcculTech (YD Diagnostics) y Human Hexagon OBTI).

El uso de anticuerpos monoclonales de ratón en el diseño de CerTest FOB-Transferrin asegura un alto grado de especificidad para la detección de hemoglobina y transferrina humana.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Towler BP, Irwig J, Glasziou P, Weller D, Kewenter J. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult. Cochrane Database Syst Rev. 2000;(2): CD001216.
2. Ransohoff DF and Lang CA. Screening for colorectal cancer with the Faecal Occult Blood Test: a background paper. Ann Intern Med. 1997; 126: 811-822.
3. Ransohoff DF and Lang CA. Suggested technique for Faecal Occult Blood testing and interpretation in colorectal cancer screening. Ann Intern Med. 1997; 126: 808-810.
4. Chien-Hua Chiang et al., "A Comparative Study of Three Faecal Occult Blood Test in Upper Gastrointestinal Bleeding". Kaohsiung J. Med. Sci. May 2006, 22; 223-228.
5. Virtanen et al., "Higher concentrations of serum transferrin receptor in children than in adults", Am. J. Clin. Nutr. 1999; 69: 256-60.

**SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**



**CerTest** BIOTEC S.L. María de Luna 11 E-50018 Zaragoza (SPAIN) www.certest.es