

IBD-CHEK[®]

An ELISA for the Detection of Lactoferrin, a Marker for
Fecal Leukocytes and an Indicator of Intestinal Inflammation
Catalog No. T5008 (96 Tests)

ESPAÑOL p. 8

ELISA para la detección de lactoferrina (marcador
de leucocitos fecales e indicador de inflamación intestinal)
Nº de catálogo T5008 (96 Pruebas)

DEUTSCH p. 14

Ein ELISA für den Nachweis von Lactoferrin, einem Marker
für Leukozyten im Stuhl und Indikator für Darmentzündung
Katalognummer T5008 (96 Tests)

FRANCAISE p. 21

Dosage immunoenzymatique (ELISA) pour le dépistage de la lactoferrine,
marqueur de leucocytes fécaux et indicateur d'inflammation intestinale
Catalogue N° T5008 (96 Analyses)

Developed and Manufactured by



Blacksburg, VA 24060

U.S. only, 1-800-TECHLAB

TEL.: (540) 953-1664 FAX: (540) 953-1665



EC REP Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands

U. S. Patent # 7,192,724

Australian Patent # 2002220029

International Symbol Key:



Catalog Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Lot Information



Contains sufficient reagents
for <n> tests



Temperature Limitation



Use By/Expiration Date



CE Symbol



Caution, consult
accompanying documents

IBD-CHEK®

INTENDED USE

The IBD-CHEK® test is an ELISA for the qualitative detection of elevated levels of lactoferrin, a marker for fecal leukocytes and an indicator of intestinal inflammation. The test can be used as an *in vitro* diagnostic aid to help identify patients with active inflammatory bowel disease (IBD) and rule out those with active irritable bowel syndrome (IBS), which is noninflammatory.

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

EXPLANATION

Inflammatory bowel disease is considered a condition of chronic inflammation. Ulcerative colitis and Crohn's disease both exhibit large numbers of leukocytes that migrate to the mucosa and into the intestinal lumen. Endoscopic examination may be used to identify inflamed intestinal mucosa in patients with IBD (3). During the diagnosis of IBD, efforts must be made to rule out other more common etiologies such as infectious colitis (e.g., those caused by *Shigella*, *Campylobacter*, and *Clostridium difficile*) (2,7). Patients with active IBD but exhibiting mild signs and symptoms may be difficult to distinguish from patients with active IBS. Unlike IBD, IBS does not involve intestinal inflammation. In persons with IBS, the intestine appears normal upon endoscopic examination and leukocytes are not present in the mucosa or in fecal specimens (1).

Human lactoferrin is an 80 kilodalton glycoprotein utilized by the IBD-CHEK® test. This iron-binding protein is secreted by most mucosal membranes and is a major component of the secondary granules of polymorphonuclear neutrophils (PMN), a primary component of the acute inflammatory response. Other hematopoietic cells such as monocytes and lymphocytes do not contain lactoferrin whereas various bodily secretions contain levels in the mg/mL range. During intestinal inflammation, leukocytes infiltrate the mucosa, increasing the level of fecal lactoferrin (4-10).

Clinical studies support the use of the IBD-CHEK® test as an *in vitro* diagnostic aid for detecting elevated levels of lactoferrin, a marker of fecal leukocytes and an indicator of intestinal inflammation. Further, our results support the use of the IBD-CHEK® test as an *in vitro* diagnostic aid to help distinguish active IBD patients from those with active IBS.

PRINCIPLE OF THE TEST

The IBD-CHEK® test uses antibodies to human lactoferrin. The microassay wells supplied with the kit contain immobilized polyclonal antibody against lactoferrin. The detecting antibody consists of polyclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase. In the assay, an aliquot of fecal specimen is emulsified in the *Diluent* and the diluted specimen is transferred to the microassay well. If elevated levels of lactoferrin are present in the specimen, the lactoferrin binds to the immobilized antibody. After incubation, the wells are washed and the antibody conjugate is added. The conjugate binds to the lactoferrin bound during the first incubation phase. A second series of wash steps removes any unbound material. Following the addition of substrate, a color is detected due to the enzyme-antibody-antigen complexes that form in the presence of lactoferrin.

REAGENTS

DIL	10X	10X Diluent , 40 mL (10X concentrate of a buffered protein solution containing 0.2% thimerosal). The 1X <i>Diluent</i> is also to be used as the negative control (see TEST PROCEDURE).
CONJ	ENZ	Conjugate , 7 mL (rabbit polyclonal antibody specific for human lactoferrin conjugated to horseradish peroxidase and in a buffered protein solution containing 0.02% thimerosal)
SUBS	REAG	Substrate , 14 mL (solution containing tetramethylbenzidine substrate and peroxide)

CONTROL +	Positive Control , 3.5 mL (human lactoferrin in a buffered protein solution containing 0.02% thimerosal)
WASHBUF 20X	Wash Buffer Concentrate , 50 mL (20X concentrate containing phosphate-buffered saline, detergent and 0.2% thimerosal)
H ₂ SO ₄ 0.6N	Stop Solution , 7 mL (0.6 N sulfuric acid). CAUTION: Avoid contact with skin. Flush with water immediately if contact occurs.
MA PLT	Microassay Plate , 12 strips, 8 wells per strip, coated with purified polyclonal antibody specific for lactoferrin (stored with desiccant)

PRECAUTIONS

1. Reagents from different kits should not be mixed. Do not use the kit past the expiration date.
2. Reagents should be at room temperature before use.
3. Gently mix all reagents before use.
4. Caps and tips are color-coded; do not mix!
5. When handling the microassay wells, avoid scratching the bottom of the wells because this may result in elevated absorbance readings.
6. Hold dropper bottles vertically to ensure proper drop size.
7. Handle specimens and used microassay wells as if capable of transmitting infectious agents. Wear gloves when doing the test.
8. Reagents contain thimerosal as a preservative and should be handled with normal laboratory caution.
9. The *Stop Solution* contains 0.6 N sulfuric acid. Flush with water immediately if contact occurs.
10. *Unused microassay wells must be placed inside the resealable pouch with the desiccant to protect them from moisture.*
11. Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions.
12. Frozen specimens (-20°C or lower) may lose activity due to freezing and thawing multiple times.
13. Do not freeze the reagents. Store the kit between 2° and 8°C.
14. The *Substrate* is light sensitive and should be protected from direct sunlight or UV sources.
15. Optimal results are obtained by following the specified test procedure. The concentrations, incubation conditions, and processing specifications have been optimized for sensitivity and specificity. Alterations of the specified procedure and/or test conditions may affect the sensitivity and specificity of the test. Normal fecal specimens contain low levels of lactoferrin and the dilutions recommended in the kit are designed to detect an increase in lactoferrin over background levels.
16. The positive control contains lactoferrin which is a human derived material. Material has been tested and found negative for antibody to HIV-1, HIV-2, HCV, and HbsAg. No known test method can offer complete assurance that infectious agents are absent. ALL HUMAN SOURCE PRODUCTS SHOULD BE HANDLED AS POTENTIALLY INFECTIOUS MATERIAL. A procedure for handling biohazards is published in the CDC/NIH *Manual of Biosafety in Microbiology & Biomedical Laboratories*.

PRELIMINARY PREPARATIONS

1. All reagents must be at room temperature prior to use in the assay.
2. **Prepare 1X Wash Solution.** The *Wash Solution* is supplied as a 20X concentrate (a precipitate may be noticed). Dilute to a total volume of 1 liter by adding 50 mL of the concentrate to 950 mL of deionized water. Label the bottle. Store any unused 1X *Wash Solution* between 2° and 8°C.
3. **Prepare 1X Diluent.** The *Diluent* is supplied as a 10X concentrate. Dilute to a total volume of 400 mL by adding 40 mL of the concentrate to 360 mL of deionized water. Label the bottle. Store any unused 1X *Diluent* between 2° and 8°C.

4. **Microassay Plate preparation.** Each Strip contains 8 wells coated with polyclonal antibody specific for lactoferrin. Each specimen or control will require one of these coated wells. Avoid contact with the bottom of the wells because this is the optical window for ELISA readers. Microassay wells not used must be returned to the plastic bag and carefully resealed with desiccant.

COLLECTION OF SPECIMENS AND PREPARATION OF DILUTIONS

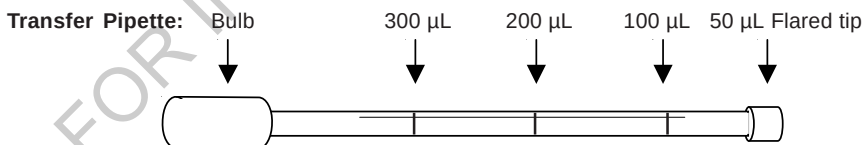
NOTE: Collect fecal specimens into a clean, airtight container. Do not use specimens that have been collected or stored in 10% formalin, merthiolate formalin, sodium acetate formalin, or polyvinyl alcohol fixatives. Specimens should be stored between 2° and 8°C or room temperature for up to 2 weeks from collection then stored frozen at -20°C or lower. Diluted specimens should be stored between 2° and 8°C for up to 48 hours then discarded. **Mix (vortex) specimens thoroughly prior to performing the assay. This includes complete mixing of the specimen prior to transfer to Diluent as well as complete mixing of the diluted specimen prior to performing the assay.**

1. Prepare Diluted Specimen.

For Liquid Fecal Specimens: Set up two plastic tubes for each specimen to be tested. For each specimen, add 950 µL of 1X *Diluent* to each of the two tubes. Use a transfer pipette to add 50 µL (flared section) of liquid fecal specimen to one of the tubes and mix well using a vortex mixer. Next, transfer 50 µL (flared section) of the previously diluted specimen into the second tube containing 950 µL of 1X *Diluent*. This represents a 1:400 dilution of the specimen and only the second tube should be used for the remainder of the test.

For Formed/Solid Fecal Specimens: Set up two plastic tubes for each specimen to be tested. For each specimen, add 950 µL of 1X *Diluent* to each of the two tubes. Use a transfer pipette to add 0.05 g (flared section) or weigh 0.05g of fecal specimen and add to the tube containing *Diluent* (1:20). Mix well using a vortex mixer. Next, transfer 50 µL (flared section) of the previously diluted specimen into the second tube. This represents a 1:400 dilution of the specimen and only the second tube should be used for the remainder of the test.

2. Vortex the tubes for 10 seconds and store between 2° and 8°C until the test is performed. Vortex again before transferring diluted specimen to microassay well. This ensures thorough mixing of the specimen.



TEST PROCEDURE

Materials provided

2 Plastic adhesive sheets

100 transfer pipettes (flared section = 50 µL)

Materials and equipment required but not provided

Squirt bottle for 1X Wash Solution

Vortex mixer

Refrigerator for storage

Tubes for dilution of specimen

Incubator set at 37°C ± 2°C

Discard container/absorbent paper

Bottle for diluted 1X *Diluent*

Deionized or distilled water

ELISA reader capable of reading 450 nm or 450/620 nm

1. Determine the number of wells to be used. Add 1 drop of *Positive Control* (black cap) to a positive control well. Use a transfer pipette to add 50 µL (flared section) of 1X *Diluent* to a negative control well. Use a transfer pipette to add 100 µL (first mark past flared section) of 1:400 diluted specimen to one well.

2. Incubate the wells at $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes.
3. Shake out the contents of the assay wells into a discard pan.
4. Wash each well using the diluted *Wash Solution* in a squirt bottle with a fine-tipped nozzle, directing the 1X *Wash Solution* to the bottom of the well with force. Fill the wells, then shake the *Wash Solution* out of the well into a discard pan. Slap the inverted plate on a dry paper towel and repeat wash steps **four times** using a dry paper towel each time. If any particulate matter is seen in the wells, continue washing until all the matter is removed.
5. Add 1 drop of *Conjugate* (red cap) to each well. Incubate the wells at $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes.
6. Repeat step #3 and #4. Dispose of all paper towels and specimen containers properly.
7. Add 2 drops of *Substrate* (blue cap) to each well. Gently tap the wells to mix the contents. Incubate the wells at room temperature for 15 minutes. Gently tap the wells 1 or 2 times during the incubation period.
8. Add 1 drop of *Stop Solution* (yellow cap) to each well. Gently tap the wells and wait 2 minutes before reading. The addition of *Stop Solution* converts the blue color to a yellow color which may be quantitated by measuring the optical density at 450 nm on a microplate ELISA reader. Wipe the underside of each well before measuring the optical density. If a dual reader is used, read at 450 nm and reference 620 nm. Read within two to ten minutes after adding *Stop Solution*.
9. Record absorbance values for the positive control, negative control, and each specimen tested.
10. Average the readings of duplicate wells before interpreting results.

QUALITY CONTROL

The positive and negative control must meet the following criteria or the test is not valid. The positive control well must be a visible yellow color. When read on a spectrophotometer, it must have an OD_{450} and $\text{OD}_{450/620}$ nm >0.500 . The negative control must have an OD_{450} <0.200 or an $\text{OD}_{450/620}$ nm <0.160 . To ensure that carryover did not occur, repeat testing if a sample gives a weak positive result (i.e., <0.400) and is adjacent to a strong positive well.

INTERPRETATION OF RESULTS

Measurements should be determined at 450 nm on a single wavelength spectrophotometer and at 450/620 nm on a dual wavelength spectrophotometer.

1. **Spectrophotometric Single Wavelength at 450 nm**
 Negative = $\text{OD}_{450} <0.200$
 Positive = $\text{OD}_{450} \geq 0.200$
2. **Spectrophotometric Dual Wavelength at 450/620 nm**
 Negative = $\text{OD}_{450/620} <0.160$
 Positive = $\text{OD}_{450/620} \geq 0.160$

A positive test result indicates the specimen contains elevated levels of lactoferrin.

A negative test result indicates the specimen does not contain elevated levels of lactoferrin.

SHELF-LIFE AND STORAGE

The expiration date of the kit is given on the outside label. Expiration dates for each component are listed on the individual labels. The kit containing the reagents with designated shelf-life should be stored between 2° and 8°C and should be returned to the refrigerator as soon as possible after use.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

There were 71 ulcerative colitis patients, 78 Crohn's disease patients, 31 irritable bowel patients, and 56 healthy persons recruited from three different IBD referral centers (one on the east coast and two in the Midwest) and TECHLAB®, Inc. Of the 40 patients with active ulcerative colitis, 35 (88%) were positive in the *IBD-CHEK*® test. There were 31 patients with inactive ulcerative colitis and 16 (52%) of these were positive in the *IBD-CHEK*® test. Of the 52 patients with active Crohn's disease, 44 (85%) were positive in the *IBD-CHEK*® test. There were 26 patients with inactive Crohn's disease and of these 16 (62%) were positive. All of the 31 irritable bowel patients (100%) and all 56 healthy persons (100%) were negative in the *IBD-CHEK*® test. The values when distinguishing active IBD, active ulcerative colitis (UC), and active Crohn's disease (CD) from active irritable bowel syndrome (IBS) and healthy persons are shown in the following table.

Value	Active IBD vs IBS and healthy persons	Active UC vs IBS and healthy persons	Active CD vs IBS and healthy persons
Sensitivity	86%	88%	85%
Specificity	100%	100%	100%
Predictive Positive Value	100%	100%	100%
Predictive Negative Value	87%	95%	92%
Correlation	93%	96%	94%

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The *IBD-CHEK*® test is a screening test that detects elevated levels of lactoferrin released from fecal leukocytes. The test may not be appropriate in immunocompromised persons. The following patient samples should be excluded from use in the *IBD-CHEK*® test: patients with a history of HIV and/or Hepatitis B and C, patients with a history of infectious diarrhea (within 6 months), and patients having had a colostomy and/or ileostomy within 1 month.
2. The dilutions of fecal specimen recommended in the brochure have been evaluated in clinical trials and have been found to be optimal for test results. The use of lower dilutions may result in positive reactions due to the presence of normal lactoferrin levels. Therefore, only the dilutions recommended in the brochure should be used.
3. At this time, the *IBD-CHEK*® test has not been clinically evaluated for use in the detection of leukocytes in other types of clinical specimens. Use the test only for the analysis of fecal specimens.
4. Fecal specimens that have been preserved in 10% Formalin, merthiolate formalin, sodium acetate formalin, or polyvinyl alcohol cannot be used.
5. Patients with IBD oscillate between active (inflammatory) and inactive (noninflammatory) stages of disease. These stages must be considered when using the *IBD-CHEK*® test.
6. Other intestinal ailments, including many gastrointestinal infections and colorectal cancer, often result in elevated levels of lactoferrin in fecal specimens and these specimens will test positive with the *IBD-CHEK*® test. Therefore, a diagnosis of active IBD cannot be established solely on the basis of a positive result with the *IBD-CHEK*® test.

CROSS-REACTIVITY

Various intestinal organisms were examined for cross-reactivity in the *IBD-CHEK*® test. For the analysis, broth cultures mixed with *1X Diluent* were evaluated. Broth

cultures at log phase containing $>10^8$ bacteria per mL were used. Organisms that did not react in the IBD-CHEK® test are as follows:

<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Fusobacterium prausnitzii</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Bacteroides distasonis</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Bacteroides eggerthii</i>	<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Clostridium novyi</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Bacteroides stercoris</i>	(types A,B,C)	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacteroides uniformis</i>	(types A,B,C,D,E)	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Clostridium tetani</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Eubacterium aerofaciens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

EFFECT OF FECAL SAMPLE CONSISTENCY

The IBD-CHEK® test detected lactoferrin in liquid, semi-solid, and solid fecal specimens at similar levels to those observed with purified lactoferrin prepared in kit Diluent.

REPRODUCIBILITY AND PRECISION

The inter-assay variation was determined by analyzing 8 lactoferrin-negative and 8 lactoferrin-positive fecal specimens over a 3 day period. The average %CV was 23.5% for the positive specimens and 7.4% for the negative specimens. The intra-assay variation was determined by analyzing 12 fecal specimens using 6 replicates in one lot of kits. The intra-assay analysis ranged in %CV from 2.7 to 24.0 with an average of 8.7%.

IBD-CHEK® - ESPAÑOL

USO PREVISTO

El test *IBD-CHEK*® es un ELISA para la detección cualitativa de niveles elevados de lactoferrina, un marcador de leucocitos fecales y un indicador de inflamación intestinal. Puede utilizarse como herramienta de ayuda diagnóstica *in vitro* para identificar a pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) activa y para descartar a los que padecen el síndrome del colon irritable (SCI), activo, que no es un proceso inflamatorio.

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

FUNDAMENTO

La enfermedad inflamatoria intestinal es un trastorno inflamatorio crónico. Tanto en la colitis ulcerosa como en la enfermedad de Crohn hay un número elevado de leucocitos que migran hacia la mucosa y la luz intestinal. En pacientes con EII puede utilizarse la exploración endoscópica para identificar la mucosa intestinal inflamada (3). Durante el diagnóstico de la EII se deben descartar otras etiologías más frecuentes, como las colitis infecciosas (p. ej., como las causadas por *Shigella*, *Campylobacter* y *Clostridium difficile*) (2,7). Puede ser complicado diferenciar a los pacientes con EII activa que presenten signos y síntomas leves de aquellos pacientes con SCI activo. A diferencia de la EII, en el SCI no se produce inflamación intestinal. En personas con SCI, la exploración endoscópica revela un intestino de aspecto normal, sin leucocitos presentes en la mucosa ni en las muestras fecales (1).

La lactoferrina humana es una glucoproteína de 80 kilodaltons que se utiliza en el test *IBD-CHEK*®. Esta proteína fijadora de hierro es segregada por la mayoría de las mucosas y es uno de los principales componentes de los gránulos secundarios de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), un elemento esencial de la respuesta inflamatoria aguda. Otras células hematopoyéticas, como los monocitos y los linfocitos, no contienen lactoferrina mientras que varias secreciones corporales contienen niveles en el rango de mg/ml. Durante la inflamación intestinal, los leucocitos se infiltran en la mucosa, aumentando el nivel de lactoferrina fecal (4-10).

Los estudios clínicos respaldan el uso del test *IBD-CHEK*® como herramienta de ayuda diagnóstica *in vitro* para detectar niveles elevados de lactoferrina, un marcador de leucocitos fecales y un indicador de inflamación intestinal. Además, nuestros resultados apoyan el uso del test *IBD-CHEK*® como herramienta de ayuda diagnóstica *in vitro* para diferenciar a pacientes que padecen EII activa de los que padecen SCI activo.

PRINCIPIO DEL TEST

En el test *IBD-CHEK*® se utilizan anticuerpos frente a la lactoferrina humana. Los pocillos de microanálisis suministrados con este kit contienen anticuerpos policlonales inmovilizados frente a lactoferrina. El anticuerpo detector es un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano picante. En el análisis, se emulsiona una parte alícuota de una muestra fecal en el *Diluyente* y la muestra diluida se transfiere al pocillo del microanálisis. Si la muestra contiene niveles elevados de lactoferrina, esta se une al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación, los pocillos se lavan y se añade el conjugado de anticuerpos. El conjugado se une a la lactoferrina durante la primera fase de incubación. Una segunda serie de pasos de lavado elimina cualquier material no unido. Tras la adición de un sustrato, se detecta un color debido a los complejos enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en presencia de lactoferrina.

REACTIVOS

DIL	10X
-----	-----

Diluyente 10x, 40 ml (concentrado 10x de una solución de proteína tamponada que contiene timerosal al 0,2%). El *Diluyente 1x* también se usa como control negativo (véase PROCEDIMIENTO DEL TEST).

CONJ | ENZ

Conjugado, 7 ml (anticuerpo policlonal de conejo específico para la lactoferrina humana conjugada con peroxidasa de rábano picante en una solución tamponada de proteínas con timerosal al 0,02%).

SUBS | REAG

Substrato, 14 ml (solución que contiene tetrametilbenzidina y peróxido).

CONTROL | +

Control Positivo, 3,5 ml (lactoferrina humana en una solución tamponada de proteínas que contiene timerosal al 0,02%).

WASHBUF | 20X

Tampón de lavado concentrado, 50 ml (concentrado 20x que contiene suero fisiológico tamponado con fosfato, detergente y timerosal al 0,2%).

H₂SO₄ | 0.6N

Solución de Parada, 7 ml (ácido sulfúrico 0,6N). **ATENCIÓN:** Evite el contacto con la piel. Aclarar inmediatamente con agua si se produce el contacto.

MA | PLT

Placa para microanálisis, 12 tiras, 8 pocillos por cada tira, recubiertos con anticuerpos policlonales purificados específicos de lactoferrina (conservados con desecante).

PRECAUCIONES

1. No deben mezclarse los reactivos de kits diferentes. No utilizar los kits después de la fecha de caducidad.
2. Los reactivos estarán a temperatura ambiente antes de su uso.
3. Mezclar suavemente todos los reactivos antes de su uso.
4. Los tapones y las puntas están codificados por colores y no deben mezclarse.
5. Cuando se manipulen pocillos de microanálisis, evitar el rascado del fondo de los pocillos, ya que esto podría causar lecturas de absorbancia elevadas.
6. Sostenga los frascos del gotero verticalmente para garantizar un tamaño de gota adecuado.
7. Manipular las muestras y los pocillos de microanálisis utilizados como potenciales transmisores de agentes infecciosos. Utilizar guantes para realizar el test.
8. Los reactivos contienen timerosal como conservante y se manipularán según las normas habituales de precaución de laboratorio.
9. La *Solución de Parada* contiene ácido sulfúrico 0,6N. Aclarar inmediatamente con agua si se produce el contacto.
10. *Los pocillos de microanálisis no utilizados deben colocarse en la bolsa resellable junto con el desecante para protegerlos de la humedad.*
11. Efectuar el procedimiento de lavado tal como se indica para evitar reacciones de fondo elevadas.
12. Las muestras congeladas (-20 °C o inferior) pueden perder actividad por múltiples ciclos de congelación y descongelación.
13. No congelar los reactivos. Conservar los kits entre 2 °C y 8 °C.
14. El *Substrato* es sensible a la luz y debe protegerse de la luz solar directa o de fuentes de UV.
15. Se obtienen resultados óptimos siguiendo el procedimiento analítico especificado. Las concentraciones, las condiciones de incubación y las especificaciones de procesamiento están optimizadas para la sensibilidad y la especificidad del test. Las alteraciones del procedimiento especificado y/o de las condiciones del test pueden afectar a su sensibilidad y especificidad. Las muestras fecales normales contienen niveles bajos de lactoferrina y las diluciones recomendadas en el kit se han diseñado para detectar un aumento de los niveles de lactoferrina con respecto a los niveles precedentes.
16. El *Control Positivo* contiene lactoferrina, un material de origen humano. El material ha sido analizado y es negativo para los anticuerpos frente a VIH-1, VIH-2, VHC y HBsAg. Ningún método conocido de análisis puede garantizar completamente la ausencia de agentes infecciosos. **TODOS LOS PRODUCTOS DE ORIGEN HUMANO DEBEN MANIPULARSE COMO MATERIAL POTENCIALMENTE INFECCIOSO.** En el Manual de Bioseguridad en Microbiología y Laboratorios Biomédicos (*Manual of Biosafety in Microbiology & Biomedical Laboratories*) de los CDC/NIH se publica un procedimiento para la manipulación de los materiales biológicos peligrosos.

PREPARACIONES PRELIMINARES

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de su uso en el análisis.
2. **Preparar la Solución de Lavado 1x.** La *Solución de Lavado* se suministra como concentrado 20x (puede apreciarse un precipitado). Diluir hasta un volumen total de 1 litro añadiendo 50 ml del concentrado a 950 ml de agua desionizada. Etiquetar el frasco. Conservar la *Solución de Lavado* 1x no utilizada entre 2 °C y 8 °C.
3. **Preparar el Diluyente 1x.** El *Diluyente* se suministra como concentrado 10x. Diluir hasta un volumen total de 400 ml añadiendo 40 ml del concentrado a 360 ml de agua desionizada. Etiquetar el frasco. Conservar el *Diluyente* 1x no utilizado entre 2 °C y 8 °C.
4. **Preparación de las Placas para Microanálisis.** Cada bolsa contiene 8 pocillos recubiertos de anticuerpo policlonal específico frente a lactoferrina. Se utilizará uno de estos pocillos recubiertos para cada muestra o control. Evitar el contacto con el fondo de los pocillos, ya que es la ventana óptica de los lectores de ELISA. Los pocillos de microanálisis no utilizados deben devolverse a la bolsa de plástico y resellarse con cuidado con desecante.

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

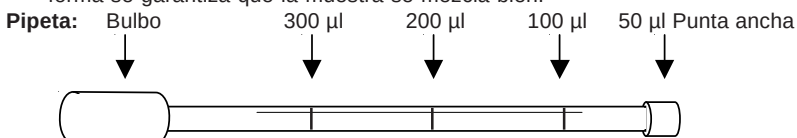
NOTA: Recoja las muestras fecales en un recipiente hermético limpio. No utilizar las muestras que se hayan recogido o almacenado con fijadores como formol al 10%, formol mertiolato, acetato sódico-formol o alcohol polivinílico. Las muestras deben conservarse a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C o a temperatura ambiente durante un plazo máximo de 2 semanas desde su obtención, congelándolas posteriormente a una temperatura igual o inferior a -20 °C. Las muestras diluidas se deben conservar a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C durante un plazo máximo de 48 horas, desechándolas posteriormente. **Mezclar completamente (con vórtex) las muestras antes del análisis. Esto incluye el mezclado completo de la muestra antes de su transferencia al Diluyente, así como el mezclado completo de la muestra diluida antes de realizar el análisis.**

1. Preparación de la muestra diluida.

Para muestras fecales líquidas: Asignar dos tubos de plástico para cada muestra que se vaya a analizar. En cada muestra, añada 950 µl de *Diluyente* 1x a ambos tubos. Utilizar una pipeta para añadir 50 µl (sección ancha) de la muestra fecal líquida a uno de los tubos y mezclar bien con un mezclador de tipo vórtex. A continuación, transferir 50 µl (sección ancha) de la muestra previamente diluida al segundo tubo que contiene 950 µl del *Diluyente* 1x. Esto equivale a una dilución 1:400 de la muestra; se debe utilizar exclusivamente el segundo tubo durante el resto del test.

Para muestras fecales formes/sólidas: Asignar dos tubos de plástico para cada muestra que se vaya a analizar. En cada muestra, añada 950 µl de *Diluyente* 1x a ambos tubos. Utilizar una pipeta para añadir 0,05 g (sección ancha) o pesar 0,05 g de la muestra fecal y añadir al tubo que contiene el *Diluyente* (1:20). Mezclar bien con un mezclador de tipo vórtex. A continuación, transfiera 50 µl (sección ancha) de la muestra previamente diluida al segundo tubo. Esto equivale a una dilución 1:400 de la muestra; se debe utilizar exclusivamente el segundo tubo durante el resto del test.

2. Mezclar con un vórtex los tubos durante 10 segundos y almacenarlos a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta que realice el análisis. Volver a mezclar en un vórtex antes de transferir la muestra diluida al pocillo de microanálisis. De esta forma se garantiza que la muestra se mezcla bien.



PROCEDIMIENTO DEL TEST

Materiales suministrados

Dos hojas adhesivas de plástico

100 pipetas (sección ancha = 50 µl)

Materiales y equipamiento necesarios no suministrados

Frasco con rociador para la *Solución de Lavado* 1x

Mezclador de tipo vórtex

Tubos para la dilución de las muestras

Nevera para conservación

Contenedor desechable/papel absorbente

Incubadora a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

Frasco para el *Diluyente* 1x diluido

Agua desionizada o destilada

Lector de ELISA con capacidad de lectura de 450 nm o 450/620 nm

1. Determinar el número de pocillos que se va a utilizar. Añadir 1 gota de *Control Positivo* (tapón negro) al pocillo de control positivo. Utilizar una pipeta para añadir 50 µl (sección ancha) del *Diluyente* 1x al pocillo de control negativo. Utilizar una pipeta para añadir 100 µl (primera marca después de la sección ancha) de la muestra diluida a 1:400 a un pocillo.
2. Incubar los pocillos a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante 30 minutos.
3. Vaciar el contenido de los pocillos de análisis a un contenedor de desechos.
4. Lavar cada pocillo con la *Solución de Lavado* diluida en un frasco con rociador con boquilla de punta fina, dirigiendo con fuerza la *Solución de Lavado* 1x al fondo del pocillo. Llenar los pocillos y a continuación transferir la *Solución de Lavado* de los pocillos a un contenedor de desechos. Golpear la placa invertida sobre una compresa de papel seca y repetir **cuatro veces** los pasos de lavado, con una compresa de papel seca cada vez. Si se observan partículas en los pocillos, seguir lavando hasta que se elimine esta materia.
5. Añadir 1 gota de *Conjugado* (tapón rojo) a cada pocillo. Incubar los pocillos a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante 30 minutos.
6. Repetir los pasos 3 y 4. Eliminar adecuadamente las compresas de papel y los contenedores de muestras.
7. Añadir dos gotas de *Substrato* (tapón azul) a cada pocillo. Percutir suavemente los pocillos para mezclar el contenido. Incubar los pocillos durante 15 minutos a temperatura ambiente. Percutir suavemente los pocillos 1 ó 2 veces durante la incubación.
8. Añadir una gota de *Solución de Parada* (tapón amarillo) a cada pocillo. Percutir suavemente los pocillos y esperar 2 minutos antes de la lectura. La adición de la *Solución de parada* convierte el color azul en amarillo, lo que puede cuantificarse determinando la densidad óptica a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA. Antes de determinar la densidad óptica, limpiar la parte inferior de cada pocillo para retirar la humedad. Si se utiliza un lector dual, leer a 450 nm y la referencia a 620 nm. Leer entre 2 y 10 minutos tras añadir la *Solución de Parada*.
9. Registrar los valores de absorbancia del control positivo, el control negativo y de cada muestra analizada.
10. Calcular el valor promedio de los pocillos duplicados antes de interpretar los resultados.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles positivo y negativo deben cumplir los siguientes criterios o el test no es válido. El pocillo del control positivo deberá tener un color amarillo visible. Cuando se lee en un espectrofotómetro, debe tener una OD_{450} y $OD_{450/620} > 0,500$. El control negativo debe tener una $OD_{450} < 0,200$ o una $OD_{450/620} < 0,160$. Para garantizar que no se ha producido ningún efecto de arrastre, debe repetirse el análisis si una muestra da un resultado débilmente positivo (p. ej., $< 0,400$) y está adyacente a un pocillo fuertemente positivo.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las mediciones deben determinarse a 450 nm en un espectrofotómetro de onda única y a 450/620 nm en un espectrofotómetro de onda doble.

1. Espectrofotómetro con longitud de onda única a 450 nm

Negativo = $OD_{450} < 0,200$

Positivo = $OD_{450} \geq 0,200$

2. Espectrofotómetro con longitud de onda doble a 450/620 nm

Negativo = $OD_{450/620} < 0,160$

Positivo = $OD_{450/620} \geq 0,160$

Un resultado positivo del test indica que la muestra contiene niveles elevados de lactoferrina.

Un resultado negativo del test indica que la muestra no contiene niveles elevados de lactoferrina.

PERÍODO DE VALIDEZ Y CONSERVACIÓN

La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta exterior. Las fechas de caducidad de cada componente se indican en las etiquetas individuales. El kit que contiene los reactivos con el período de validez indicado debe conservarse entre 2° y 8 °C y debe reintegrarse al frigorífico tan pronto como sea posible después de su uso.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Se reclutó a 71 pacientes con colitis ulcerosa, 78 con enfermedad de Crohn, 31 con síndrome del colon irritable y a 56 personas sanas procedentes de tres centros diferentes de referencia especializados en EII (uno en la costa este y dos en la región del medio oeste) y de TECHLAB®, Inc. De los 40 pacientes con colitis ulcerosa activa, en 35 (88%) se obtuvo un resultado positivo en el test *IBD-CHEK*®. Hubo 31 pacientes con colitis ulcerosa inactiva y en 16 (52%) de ellos se obtuvo un resultado positivo en el test *IBD-CHEK*®. De los 52 pacientes con enfermedad de Crohn activa, en 44 (85%) se obtuvo un resultado positivo en el test *IBD-CHEK*®. Hubo 26 pacientes con enfermedad de Crohn inactiva y en 16 (62%) de estos pacientes se obtuvo un resultado positivo. En los 31 pacientes con colon irritable (100%) y las 56 personas sanas (100%) se obtuvieron resultados negativos en el test *IBD-CHEK*®. En la siguiente tabla se muestran los valores que diferencian la EII activa, la colitis ulcerosa (CU) activa y la enfermedad de Crohn (EC) activa del síndrome de colon irritable (SCI) activo y de las personas sanas.

Valor	EII activa frente a SCI y personas sanas	CU activa frente a SCI y personas sanas	EC activa frente a SCI y personas sanas
Sensibilidad	86%	88%	85%
Especificidad	100%	100%	100%
Valor predictivo positivo	100%	100%	100%
Valor predictivo negativo	87%	95%	92%
Correlación	93%	96%	94%

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- IBD-CHEK*® es un test de cribado que detecta niveles elevados de lactoferrina liberada por los leucocitos fecales. Es posible que la prueba no sea adecuada en personas inmunocomprometidas. Se excluirán del uso del test *IBD-CHEK*® las muestras de los siguientes pacientes: pacientes con antecedentes de VIH o hepatitis B y C, pacientes con antecedentes de diarrea infecciosa (en los 6 meses anteriores) y pacientes a los que se les ha practicado una colostomía o una ileostomía durante el mes precedente.

2. Las diluciones de las muestras fecales recomendadas en el folleto se han evaluado en estudios clínicos y se ha determinado que sus resultados son óptimos. El uso de diluciones menores puede generar reacciones positivas debido a la presencia de niveles normales de lactoferrina. Por tanto, sólo deben utilizarse las diluciones recomendadas en el folleto.
3. Por el momento, no se ha evaluado clínicamente el uso del test *IBD-CHEK*® en la detección de leucocitos en otros tipos de muestras clínicas. Utilice el test exclusivamente para el análisis de muestras fecales.
4. No pueden utilizarse muestras fecales conservadas en formol al 10%, formol mertiolato, formol acetato sódico o alcohol polivinílico.
5. Los pacientes con EII oscilan entre las fases activa (inflamatoria) e inactiva (no inflamatoria) de la enfermedad. Se deben tener en cuenta estas fases cuando se utilice el test *IBD-CHEK*®.
6. Otros trastornos intestinales, como muchas infecciones gastrointestinales y el cáncer colorrectal, a menudo se acompañan de niveles elevados de lactoferrina en las muestras fecales, por lo que producirán resultados positivos en el test *IBD-CHEK*®. Por consiguiente, no se puede establecer el diagnóstico de EII activa basándose exclusivamente en un resultado positivo del test *IBD-CHEK*®.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se ha evaluado la reactividad cruzada de diferentes microorganismos intestinales con el test *IBD-CHEK*®. En el análisis se evaluaron cultivos de caldo mixtos con *Diluyente* 1x. Se utilizaron cultivos de caldo en fase logarítmica que contenían $>10^8$ bacterias por ml. Los microorganismos no reactivos en el test *IBD-CHEK*® son los siguientes:

<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Fusobacterium prausnitzii</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Bacteroides distasonis</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Bacteroides eggerthii</i>	<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Clostridium novyi</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Bacteroides stercoris</i>	(types A,B,C)	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacteroides uniformis</i>	(types A,B,C,D,E)	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Clostridium tetani</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Eubacterium aerofaciens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

EFFECTO DE LA CONSISTENCIA DE LA MUESTRA FECAL

El test *IBD-CHEK*® detectó niveles de lactoferrina en muestras fecales sólidas, semisólidas y líquidas similares a los observados con lactoferrina purificada preparada en el *Diluyente* del kit.

REPRODUCIBILIDAD Y PRECISIÓN

Se determinó la variación interanalítica analizando 8 muestras fecales con resultado negativo para lactoferrina y 8 muestras fecales con resultado positivo para lactoferrina durante un periodo de 3 días. El CV porcentual medio fue del 23,5% en las muestras con resultado positivo y del 7,4% en las muestras con resultado negativo. Se determinó la variación intraanalítica analizando 12 muestras fecales utilizando 6 repeticiones en un lote de kits. El CV porcentual medio del análisis intraanalítico osciló entre 2,7 y 24,0, con un valor promedio del 8,7%.

IBD-CHEK® - DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der **IBD-CHEK®** Test ist ein ELISA für den qualitativen Nachweis einer erhöhten Lactoferrinkonzentration, einem Marker für Leukozyten im Stuhl und Indikator für Darmentzündung. Der Test dient als Hilfsmittel zur *in vitro* Diagnose für die Identifizierung von Patienten mit aktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED) und den Ausschluss von Patienten mit aktivem nicht entzündlichem Reizdarmsyndrom (RDS).

IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM.

ERKLÄRUNG

CED ist eine chronische Entzündungskrankheit. Colitis ulcerosa und Morbus Crohn weisen beide eine hohe Anzahl an Leukozyten auf, die zur Schleimhaut und in das Darmlumen wandern. Eine endoskopische Untersuchung kann bei der Identifizierung einer entzündeten Darmschleimhaut bei Patienten mit CED helfen (3). Bei der Diagnose von CED ist darauf zu achten, andere, häufiger auftretende Ätiologien wie etwa infektiöse Colitis (z. B. durch *Shigella*, *Campylobacter* und *Clostridium difficile* verursacht) auszuschließen (2,7). Patienten mit aktiver CED, die jedoch nur leichte Anzeichen und Symptome aufweisen, sind möglicherweise schwer von Patienten mit aktivem RDS zu unterscheiden. Im Gegensatz zu CED steht RDS nicht mit einer Darmentzündung in Verbindung. Personen mit RDS weisen bei der endoskopischen Untersuchung einen normalen Darm auf, und es sind keine Leukozyten in der Schleimhaut oder Stuhlproben vorhanden (1).

Menschliches Lactoferrin ist ein 80 Kilodalton schweres Glykoprotein und wird für den **IBD-CHEK®** Test verwendet. Dieses eisenbindende Protein wird über die meisten Schleimhautmembranen ausgeschieden und ist ein Hauptbestandteil der sekundären Granula polymorphkerniger Neutrophilen (PMN), einer Hauptkomponente der akuten Entzündungsreaktion. Andere hämatopoetische Zellen wie etwa Monozyten und Lymphozyten enthalten kein Lactoferrin, während verschiedene Körpersekrete Konzentrationen im mg/ml-Bereich aufweisen. Bei einer Darmentzündung infiltrieren Leukozyten die Schleimhaut und erhöhen so die Lactoferrinkonzentration im Stuhl (4-10).

Klinische Studien unterstützen die Verwendung des **IBD-CHEK®** Tests als Hilfe bei der *in vitro* Diagnose für den Nachweis einer erhöhten Lactoferrinkonzentration, einem Marker für Leukozyten im Stuhl und Indikator für Darmentzündung. Zudem unterstützen unsere Ergebnisse die Verwendung des **IBD-CHEK®** Tests als Hilfe bei der *in vitro* Diagnose zur Unterscheidung von Patienten mit aktiver CED von jenen mit aktivem RDS.

TESTPRINZIP

Der **IBD-CHEK®** Test verwendet Antikörper gegen menschliches Lactoferrin. Die mit dem Kit mitgelieferten Mikrotiterplattenkavitäten enthalten einen immobilisierten polyklonalen Antikörper gegen Lactoferrin. Der Antikörper für den Nachweis besteht aus einem polyklonalen Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Bei dem Test wird ein Aliquot einer Stuhlprobe im *Verdünnungspuffer* emulgiert und die verdünnte Probe in die Mikrotiterplattenkavität übertragen. Wenn erhöhte Lactoferrinkonzentrationen in der Probe vorhanden sind, bindet das Lactoferrin an den immobilisierten Antikörper. Nach der Inkubation werden die Vertiefungen gewaschen und das Antikörperkonjugat hinzugefügt. Das Konjugat bindet an das während der ersten Inkubationsphase gebundene Lactoferrin. Nicht gebundenes Material wird durch eine zweite Serie von Waschschritten entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wird aufgrund der Enzym-Antikörper-Antigen-Komplexe, die sich in Gegenwart von Lactoferrin bilden, eine Färbung nachgewiesen.

REAGENZILIEN

DIL	10X
-----	-----

10x-Verdünnungspuffer, 40 ml (10x-Konzentrat einer gepufferten Proteinlösung mit 0,2% Thimerosal). Der 1x-Verdünnungspuffer wird auch als negative Kontrolle verwendet (siehe TESTVERFAHREN).

CONJ	ENZ
------	-----

Konjugat, 7 ml (für menschliches Lactoferrin spezifischer polyklonaler Antikörper (Kaninchen), gebunden an Meerrettich-Peroxidase und in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal)

SUBS	REAG
------	------

Substrat, 14 ml (Lösung aus Tetramethylbenzidinsubstrat und Peroxid).

CONTROL	+
---------	---

Positive Kontrolle, 3,5 ml (menschliches Lactoferrin in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal).

WASHBUF	20X
---------	-----

Waschpuffer-Konzentrat, 50 ml (20x-Konzentrat mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, Detergenz und 0,2% Thimerosal).

H ₂ SO ₄	0,6N
--------------------------------	------

Stopplösung, 7 ml (0,6 N Schwefelsäure). VORSICHT: Kontakt mit der Haut vermeiden. Bei Kontakt sofort mit Wasser abspülen.

MA	PLT
----	-----

Mikrotiterplatte, 12 Streifen, 8 Kavitäten pro Streifen, beschichtet mit Lactoferrin-spezifischem, gereinigtem, polyklonalem Antikörper (mit Trockenmittel gelagert).

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Reagenzien aus verschiedenen Kits nicht mischen. Verwenden Sie das Kit nicht nach dem Verfallsdatum.
2. Die Reagenzien müssen vor dem Gebrauch Raumtemperatur annehmen.
3. Alle Reagenzien vor Gebrauch vorsichtig mischen.
4. Verschlüsse und Spitzen sind farbkodiert; nicht vertauschen!
5. Achten Sie beim Umgang mit den Vertiefungen darauf, diese nicht zu verkratzen, da dies zu erhöhten Absorptionsmesswerten führen kann.
6. Halten Sie die Tropfflaschen senkrecht, um die richtige Tropfengröße sicherzustellen.
7. Behandeln Sie die Proben und gebrauchten Vertiefungen als infektiöses Material. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Handschuhe.
8. Die Reagenzien enthalten Thimerosal als Konservierungsstoff und sind gemäß üblicher Laborpraxis mit Vorsicht zu behandeln.
9. Die Stopplösung enthält 0,6 N Schwefelsäure. Bei Kontakt sofort mit Wasser abspülen.
10. *Nicht verwendete Kavitäten der Mikrotiterplatte müssen mit Trockenmittel zurück in den wiederverschließbaren Beutel gegeben werden, damit sie vor Feuchtigkeit geschützt sind.*
11. Führen Sie das Waschverfahren nach Anweisung durch, um starke Hintergrundreaktionen zu vermeiden.
12. Gefrorene Proben (-20 °C oder niedriger) können bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen an Aktivität verlieren.
13. Reagenzien nicht einfrieren. Lagern Sie das Kit zwischen 2 °C und 8 °C.
14. Das Substrat ist lichtempfindlich und muss vor direktem Sonnenlicht und UV-Quellen geschützt werden.
15. Wenn das angegebene Testverfahren befolgt wird, werden optimale Ergebnisse erzielt. Die Konzentrationen, Inkubationsbedingungen und Verfahrensdetails wurden in Bezug auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Abweichungen vom angegebenen Verfahren und/oder Änderungen der Testbedingungen können die Sensitivität und Spezifität des Tests beeinflussen. Normale Stuhlproben enthalten niedrige Lactoferrinkonzentrationen. Die im Kit empfohlenen Verdünnungen sind für den Nachweis eines Lactoferrinanstiegs über Hintergrundkonzentrationen vorgesehen.
16. Die positive Kontrolle enthält Lactoferrin menschlicher Herkunft. Das Material wurde getestet und als negativ auf Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, HCV und HbsAg befunden. Das Vorhandensein von Infektionsträgern kann jedoch mit keiner bekannten Testmethode vollständig ausgeschlossen werden. ALLE PRODUKTE

MENSCHLICHER HERKUNFT SIND ALS POTENZIELL INFEKTIÖS ZU BEHANDELN. Im CDC/NIH-Handbuch für Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Labors ist die Verfahrensweise für den Umgang mit biologischen Gefahrstoffen veröffentlicht.

VORBEREITUNGEN

1. Vor der Testverwendung müssen alle Reagenzien Raumtemperatur angenommen haben.
2. **Bereiten Sie die 1X-Waschlösung zu.** Die *Waschlösung* wird als 20X-Konzentrat geliefert (möglicherweise ist ein Präzipitat sichtbar). Verdünnen Sie auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter, indem Sie 50 ml Konzentrat zu 950 ml entionisiertem Wasser hinzufügen. Beschriften Sie die Flasche. Lagern Sie nicht gebrauchte 1X-*Waschlösung* zwischen 2 °C und 8 °C.
3. **Bereiten Sie den 1x-Verdünnungspuffer zu.** Der *Verdünnungspuffer* wird als 10x-Konzentrat geliefert. Verdünnen Sie auf ein Gesamtvolumen von 400 ml, indem Sie 40 ml Konzentrat zu 360 ml entionisiertem Wasser hinzufügen. Beschriften Sie die Flasche. Lagern Sie nicht gebrauchten 1x-*Verdünnungspuffer* zwischen 2 °C und 8 °C.
4. **Vorbereitung der Mikrotiterplatte.** Jeder Streifen enthält 8 Vertiefungen, die mit Lactoferrin-spezifischem polyklonalem Antikörper beschichtet sind. Für jede Probe bzw. Kontrolle ist eine dieser beschichteten Vertiefungen erforderlich. Berühren Sie nicht den Boden der Vertiefungen, da dieser das optische Fenster für das ELISA-Lesegerät darstellt. Nicht verwendete Mikrotiterplattenkavitäten müssen zurück in den Kunststoffbeutel gegeben und mit Trockenmittel gut verschlossen werden.

PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG DER VERDÜNNUNGEN

BITTE BEACHTEN: Sammeln Sie die Stuhlproben in einem sauberen, luftdichten Behälter. Verwenden Sie keine Proben, die in 10% Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol gesammelt oder gelagert wurden. Lagern Sie die Proben zwischen 2° und 8°C bzw. bei Raumtemperatur für bis zu 2 Wochen ab Entnahme. Danach müssen sie bei mindestens -20°C eingefroren werden. Verdünnte Proben können zwischen 2° und 8°C für bis zu 48 Stunden gelagert werden. Danach müssen sie entsorgt werden. **Mischen (vortexen) Sie die Proben gründlich vor der Durchführung des Tests. Sowohl die Probe vor der Übertragung in den Verdünnungspuffer als auch die verdünnte Probe vor Durchführung des Tests müssen vollständig gemischt werden.**

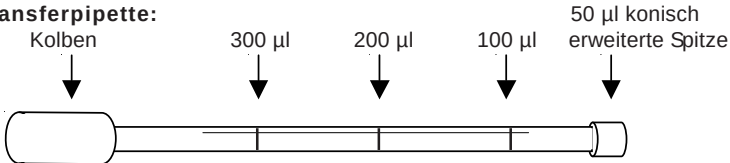
1. Zubereitung der verdünnten Proben.

Für flüssige Stuhlproben: Bereiten Sie für jede zu testende Probe zwei Kunststoffreagenzröhrchen vor. Geben Sie für jede Probe 950 µl des 1x-*Verdünnungspuffers* in jedes der beiden Reagenzröhrchen. Fügen Sie mit einer Transferpipette 50 µl (konisch erweiterter Bereich) der flüssigen Stuhlprobe in eines der Reagenzröhrchen hinzu, und mischen Sie gut mit einem Vortex-Schüttler. Übertragen Sie nun 50 µl (konisch erweiterter Bereich) der zuvor verdünnten Probe in das zweite Reagenzröhrchen mit 950 µl 1X-*Verdünnungspuffer*. Dies stellt eine 1:400 Verdünnung der Stuhlprobe dar, und nur das zweite Reagenzröhrchen darf für den restlichen Test verwendet werden.

Für feste Stuhlproben: Bereiten Sie für jede zu testende Probe zwei Kunststoffreagenzröhrchen vor. Geben Sie für jede Probe 950 µl des 1x-*Verdünnungspuffers* in jedes der beiden Reagenzröhrchen. Geben Sie mithilfe einer Transferpipette (konisch erweiterter Bereich) oder mittels Abwiegen 0,05 g Stuhlprobe in das Reagenzröhrchen mit dem Verdünnungspuffer (1:20). Mischen Sie gut mit einem Vortex-Schüttler. Übertragen Sie nun 50 µl (konisch erweiterter Bereich) der zuvor verdünnten Probe in das zweite Reagenzröhrchen. Dies stellt eine 1:400 Verdünnung der Stuhlprobe dar und nur das zweite Reagenzröhrchen darf für den restlichen Test verwendet werden.

2. Vortexen Sie die Reagenzröhrchen 10 Sekunden und lagern Sie diese bis zur Testdurchführung zwischen 2 °C und 8 °C. Vortexen Sie erneut, bevor Sie die verdünnte Probe in die Mikrotiterplattenkavität übertragen. Damit ist eine gründliche Durchmischung der Probe gewährleistet.

Transferpipette:



TESTVERFAHREN

Packungsinhalt

2 Kunststoff-Klebebögen

100 Transferpipetten (konisch erweiterter Bereich = 50 µl)

Benötigte, aber nicht enthaltene Materialien

Spritzflasche für 1x-Waschlösung

Vortex-Schüttler

Kühlschrank für die Lagerung

Reagenzröhrchen zur

Probenverdünnung

Inkubator auf 37°C ± 2°C eingestellt

Flasche für verdünnten 1x-Verdünnungspuffer

Abfallbehälter/Saugpapier

Entionisiertes oder destilliertes Wasser

ELISA-Lesegerät für eine Wellenlänge von 450 nm oder 450/620 nm

- Legen Sie die Anzahl der zu verwendenden Vertiefungen fest. Geben Sie einen Tropfen *positive Kontrolle* (schwarzer Verschluss) in eine Vertiefung für die positive Kontrolle. Geben Sie mithilfe einer Transferpipette 50 µl (konisch erweiterter Bereich) des 1x-Verdünnungspuffers in eine Vertiefung für die negative Kontrolle. Geben Sie mithilfe einer Transferpipette 100 µl (erste Markierung hinter dem konisch erweiterten Bereich) der 1:400 verdünnten Probe in eine Vertiefung.
- Inkubieren Sie die Vertiefungen bei 37 °C ± 2 °C 30 Minuten lang.
- Schütteln Sie den Inhalt der Mikrokavitäten in eine Abfallschale aus.
- Waschen Sie jede Vertiefung mit der verdünnten *Waschlösung* aus einer Spritzflasche mit feiner Düse, indem Sie die 1x-*Waschlösung* jeweils kraftvoll auf den Boden der Vertiefung richten. Füllen Sie die Vertiefungen und schütteln Sie die *Waschlösung* aus der Vertiefung in eine Abfallschale aus. Schlagen Sie die umgedrehte Platte gegen ein trockenes Papiertuch, und wiederholen Sie die Waschschrte **vier Mal**, wobei Sie jedes Mal ein trockenes Papiertuch verwenden. Wenn in den Vertiefungen Partikel sichtbar sind, fahren Sie mit dem Waschen fort, bis alle Partikel entfernt sind.
- Geben Sie einen Tropfen *Konjugat* (roter Verschluss) in jede Vertiefung. Inkubieren Sie die Vertiefungen 30 Minuten lang bei 37 °C ± 2 °C.
- Wiederholen Sie die Schritte 3 und 4. Entsorgen Sie alle Papiertücher und Probenbehälter ordnungsgemäß.
- Geben Sie 2 Tropfen *Substrat* (blauer Verschluss) in jede Vertiefung. Klopfen Sie zum Mischen des Inhalts sanft gegen die Vertiefungen. Inkubieren Sie die Vertiefungen 15 Minuten lang bei Raumtemperatur. Klopfen Sie während der Inkubationszeit 1 oder 2 Mal sanft gegen die Vertiefungen.
- Geben Sie 1 Tropfen *Stopplösung* (gelber Verschluss) in jede Vertiefung. Klopfen Sie sanft gegen die Vertiefungen, und warten Sie bis zum Ablesen 2 Minuten. Durch Zugabe der *Stopplösung* wandelt sich die blaue Färbung in eine gelbe Färbung um. Dieser Effekt kann quantifiziert werden, indem die optische Dichte bei 450 nm mit einem ELISA-Lesegerät gemessen wird. Wischen Sie vor Messung der optischen Dichte die Unterseite jeder Vertiefung ab. Wenn Sie ein Lesegerät für zwei Wellenlängen benutzen, lesen Sie bei 450 nm ab und verwenden Sie den

Wert bei 620 nm als Referenzwert. Lesen innerhalb von zwei bis zehn Minuten nach Zugabe der *Stopplösung* ab.

9. Messen Sie die Absorptionswerte für die positive und negative Kontrolle sowie für alle getesteten Proben.
10. Mitteln Sie die Messwerte der doppelten Vertiefungen vor der Interpretation der Ergebnisse.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die positive und negative Kontrolle müssen folgende Kriterien erfüllen, andernfalls ist der Test ungültig. Die Vertiefung der positiven Kontrolle muss eine sichtbare gelbe Färbung aufweisen. Beim Ablesen mit einem Spektrophotometer muss die optische Dichte bei 450 und 450/620 nm $>0,500$ sein. Die negative Kontrolle muss eine optische Dichte bei 450 $<0,200$ bzw. bei 450/620 nm $<0,160$ aufweisen. Um sicherzustellen, dass keine Verschleppung stattgefunden hat, wiederholen Sie den Test, wenn eine Probe, die neben einer stark positiven Vertiefung liegt, ein schwach positives Ergebnis (d. h. $<0,400$) liefert.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Messungen müssen mit einem Spektrophotometer für eine Wellenlänge bei 450 nm und mit einem Spektrophotometer für zwei Wellenlängen bei 450/620 nm vorgenommen werden.

1. Spektrophotometrie mit einer Wellenlänge bei 450 nm

Negativ = $OD_{450} <0,200$

Positiv = $OD_{450} \geq 0,200$

2. Spektrophotometrie mit zwei Wellenlängen bei 450/620 nm

Negativ = $OD_{450/620} <0,160$

Positiv = $OD_{450/620} \geq 0,160$

Ein positives Testergebnis weist darauf hin, dass die Probe eine erhöhte Lactoferrinkonzentration enthält.

Ein negatives Testergebnis weist darauf hin, dass die Probe keine erhöhte Konzentration an Lactoferrin enthält.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Packungsetikett angegeben. Das jeweilige Verfallsdatum für die einzelnen Bestandteile ist auf den einzelnen Etiketten angegeben. Das Kit mit den Reagenzien mit ausgewiesener Haltbarkeit muss zwischen 2 °C und 8 °C gelagert und nach dem Gebrauch so schnell wie möglich wieder in den Kühlschrank gestellt werden.

LEISTUNGSDATEN

71 Patienten mit Colitis ulcerosa, 78 mit Morbus Crohn, 31 mit Reizdarm sowie 56 gesunde Personen wurden von drei verschiedenen CED-Referenzzentren (eines an der Ostküste und 2 mit mittleren Westen der USA) und TECHLAB®, Inc. aufgenommen. Von den 40 Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa lieferten 35 (88%) ein positives Ergebnis beim *IBD-CHEK*® Test. Von den 31 Patienten mit inaktiver Colitis ulcerosa waren 16 (52%) positiv beim *IBD-CHEK*® Test. Von den 52 Patienten mit aktivem Morbus Crohn waren 44 (85%) positiv beim *IBD-CHEK*® Test. Von den 26 Patienten mit inaktivem Morbus Crohn waren 16 (62%) positiv. Alle 31 Patienten mit Reizdarm (100%) sowie alle 56 gesunden Personen (100%) lieferten ein negatives Ergebnis beim *IBD-CHEK*® Test. Die Werte bei der Unterscheidung aktiver CED, aktiver Colitis ulcerosa (CU) und aktivem Morbus Crohn (MC) von aktivem Reizdarmsyndrom (RDS) sowie gesunden Personen sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Wert	Aktive CED im Vgl. Zu RDS und gesunden Personen	Aktive CU im Vgl. Zu RDS und gesunden Personen	Aktiver MC im Vgl. zu RDS und gesunden Personen
Sensitivität	86%	88%	85%
Spezifität	100%	100%	100%
Pos. Vorhersagewert	100%	100%	100%
Neg. Vorhersagewert	87%	95%	92%
Korrelation	93%	96%	94%

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Der *IBD-CHEK*® Test ist ein Screeningtest für den Nachweis erhöhter Lactoferrinkonzentrationen aus Leukozyten in Stuhlproben. Der Test ist möglicherweise nicht für immungeschwächte Personen geeignet. Proben folgender Patienten sollten nicht mit dem *IBD-CHEK*® Test analysiert werden: Patienten mit HIV und/oder Hepatitis B und C in der Vorgeschichte, Patienten mit vorangegangener infektiöser Diarrhoe (innerhalb von 6 Monaten) sowie Patienten, die vor bis zu einem Monat einer Kolostomie und/oder Ileostomie unterzogen wurden.
2. Die in der Gebrauchsanweisung empfohlenen Verdünnungen für Stuhlproben wurden in klinischen Studien geprüft, und es zeigte sich, dass damit optimale Testergebnisse erzielt werden. Die Verwendung niedrigerer Verdünnungen kann aufgrund des Vorhandenseins normaler Lactoferrinwerte zu positiven Reaktionen führen. Daher sollten nur die empfohlenen Verdünnungen verwendet werden.
3. Bis dato wurde der *IBD-CHEK*® Test noch nicht klinisch für den Nachweis von Leukozyten in anderen klinischen Probenformen evaluiert. Verwenden Sie den Test nur für die Analyse von Stuhlproben.
4. Stuhlproben, die in 10% Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol konserviert wurden, dürfen nicht verwendet werden.
5. Patienten mit CED schwanken zwischen aktiven (entzündlichen) und inaktiven (nicht entzündlichen) Krankheitsstadien. Diese Stadien müssen bei Verwendung des *IBD-CHEK*® Tests berücksichtigt werden.
6. Andere Darmleiden, u. A. zahlreiche Magen-Darm-Infektionen und kolorektales Karzinom, führen oft zu erhöhten Lactoferrinwerten in Stuhlproben; diese Proben liefern beim *IBD-CHEK*® Test ein positives Ergebnis. Daher darf die Diagnose einer aktiven CED nicht ausschließlich auf Basis eines positiven Ergebnisses mit dem *IBD-CHEK*® Test gestellt werden.

KREUZREAKTIVITÄT

Verschiedene im Darm angesiedelte Organismen wurden mit dem *IBD-CHEK*® Test auf Kreuzreaktivität untersucht. Für die Analyse wurden mit 1x-Verdünnungspuffer vermischte Bouillonkulturen evaluiert. Es wurden Bouillonkulturen in der Protokollphase mit $>10^8$ Bakterien/ml verwendet. Folgende Organismen reagierten nicht im *IBD-CHEK*® Test:

Acinetobacter lwoffii
Aeromonas hydrophila
Bacillus cereus
Bacillus subtilis
Bacteroides distasonis
Bacteroides eggerthii
Bacteroides fragilis
Bacteroides ovatus
Bacteroides stercoris

Candida krusei
Candida tropicalis
Clostridium bifermentans
Clostridium chauvoei
Clostridium difficile
Clostridium haemolyticum
Clostridium histolyticum
Clostridium novyi
 (types A,B,C)

Escherichia coli
Fusobacterium prausnitzii
Klebsiella pneumoniae
Peptostreptococcus anaerobius
Proteus vulgaris
Pseudomonas aeruginosa
Salmonella choleraesuis
Salmonella enteritidis
Salmonella typhi

<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacteroides uniformis</i>	(types A,B,C,D,E)	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Clostridium tetani</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Eubacterium aerofaciens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

AUSWIRKUNGEN DER STUHLPROBENKONSISTENZ

Der IBD-CHEK® Test wies Lactoferrin in flüssigen, halbfesten und festen Stuhlproben in ähnlichen Konzentration wie jene nach, die bei gereinigtem, in Verdünnungspuffer zubereitetem Lactoferrin beobachtet wurden.

REPRODUZIERBARKEIT UND PRÄZISION

Die Inter-Assay-Variation wurde mittels Analyse von 8 Lactoferrin-negativen und 8 Lactoferrin-positiven Stuhlproben in einem Zeitraum von 3 Tagen bestimmt. Der mittlere VK lag bei 23,5% für die positiven Proben und 7,4% für die negativen Proben. Die Intra-Assay-Variation wurde mittels Analyse von 12 Stuhlproben unter Verwendung von 6 Replikaten in einer Kitcharge bestimmt. Der Intra-Assay-VK lag zwischen 2,7% und 24,0% mit einem Mittelwert von 8,7%.

FOR INFORMATIONAL USE ONLY

IBD-CHEK® - FRANCAIS

UTILISATION PRÉVUE

Le test *IBD-CHEK*® est un dosage immunoenzymatique (ELISA) de dépistage qualitatif des concentrations élevées de lactoferrine, marqueur de leucocytes fécaux et indicateur d'inflammation intestinale. Ce test peut être utilisé comme outil diagnostique *in vitro* pour identifier les patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) active et exclure les patients souffrant de syndrome du côlon irritable actif, qui n'est pas d'origine inflammatoire.

POUR UNE UTILISATION DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

EXPLICATION

La maladie inflammatoire chronique de l'intestin est considérée comme une pathologie d'inflammation chronique. La recto-colite hémorragique et la maladie de Crohn présentent toutes deux un grand nombre de leucocytes qui migrent de la muqueuse vers la lumière intestinale. L'examen endoscopique peut être utilisé pour identifier la muqueuse enflammée chez les patients souffrant de MICI (3). Lors du diagnostic de la MICI, il faut veiller à exclure d'autres étiologies plus fréquentes comme la colite infectieuse (par ex. provoquée par *Shigella*, *Campylobacter* ou *Clostridium difficile*) (2,7). Les patients atteints de MICI active mais dont les signes et symptômes sont modérés peuvent être difficiles à distinguer des patients souffrant de syndrome du côlon irritable actif. Contrairement aux MICI, le syndrome du côlon irritable n'implique pas d'inflammation intestinale. Chez les personnes atteintes du syndrome du côlon irritable, les intestins semblent normaux lors de l'examen endoscopique et les leucocytes sont absents de la muqueuse ou des échantillons de selles (1).

La lactoferrine humaine est une glycoprotéine de 80 kilodaltons utilisée par le test *IBD-CHEK*®. Cette protéine liée au fer et sécrétée par la plupart des membranes muqueuses est un composant majeur des granulations secondaires des neutrophiles polymorphonucléaires (PMN), composant principal de la réponse inflammatoire aiguë. D'autres cellules hématopoïétiques comme les monocytes et les lymphocytes ne contiennent pas de lactoferrine alors que diverses sécrétions corporelles contiennent des taux qui atteignent plusieurs mg/ml. En cas d'inflammation intestinale, les leucocytes infiltrant la muqueuse, augmentant le taux de lactoferrine fécale (4-10).

Les études cliniques étayaient l'utilisation du test *IBD-CHEK*® comme outil diagnostique *in vitro* pour dépister les concentrations accrues de lactoferrine, marqueur de leucocytes fécaux et indicateur d'inflammation intestinale. En outre, nos résultats montrent que l'utilisation du test *IBD-CHEK*® comme outil diagnostique *in vitro* peut contribuer à distinguer les patients souffrant de MICI active de ceux atteints du syndrome du côlon irritable actif.

PRINCIPE DU TEST

Le test *IBD-CHEK*® utilise les anticorps de la lactoferrine humaine. Les micropuits fournis dans le kit contiennent des anticorps polyclonaux immobilisés anti-lactoferrine. L'anticorps de dépistage est composé d'anticorps polyclonaux conjugués à la peroxydase de raifort. Dans l'essai, une aliquote d'un échantillon de selles est émulsifiée dans le *Diluant* et l'échantillon dilué est transféré dans le micropuits. Si de fortes concentrations de lactoferrine sont présentes dans l'échantillon, la lactoferrine se lie à l'anticorps immobilisé. Après incubation, les puits sont lavés et le conjugué d'anticorps est ajouté. Le conjugué se lie à la lactoferrine liée pendant la première phase d'incubation. Les produits non liés sont ensuite éliminés par une seconde série de lavages. L'adjonction du substrat entraîne une modification de la coloration suite à la formation d'un complexe enzyme-anticorps-antigène en présence de lactoferrine.

REACTIFS

DIL	10X
-----	-----

Diluant 10X, 40 ml (Solution concentrée 10X d'une solution de protéine tamponnée contenant du thimérosal à 0,2 %). Le *Diluant 1X* est également utilisé en tant que contrôle négatif (voir PROCÉDURE DE TEST).

CONJ	ENZ
------	-----

Conjugué, 7 ml (anticorps polyclonal de lapin spécifique de la lactoferrine humaine conjugué à la peroxydase de raifort dans une solution de protéine tamponnée contenant du thimérosal à 0,02 %)

SUBS	REAG
------	------

Substrat, 14 ml (solution contenant un substrat de tétraméthylbenzidine et du peroxyde).

CONTROL	+
---------	---

Contrôle positif, 3,5 ml (lactoferrine humaine dans une solution de protéine tamponnée contenant du thimérosal à 0,02 %)

WASHBUF	20X
---------	-----

Tampon de lavage concentré, 50 ml (concentré à 20X contenant une solution saline tamponnée au phosphate, un détergent et du thimérosal à 0,2%).

H ₂ SO ₄	0.6N
--------------------------------	------

Solution d'arrêt, 7 ml (0,6 N d'acide sulfurique). ATTENTION : éviter tout contact avec la peau. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau.

MA	PLT
----	-----

Microploques, 12 bandes, 8 micropuits par bande, enduits d'anticorps polyclonaux purifiés spécifiques de la lactoferrine (sous emballage contenant un dessiccateur)

PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés. Ne pas utiliser le kit si la date d'expiration est dépassée.
2. Les réactifs doivent être à température ambiante avant utilisation.
3. Mélanger doucement les réactifs avant utilisation.
4. Les capsules et les embouts sont classés par couleur. Ne pas les mélanger !
5. Lors des manipulations, éviter d'érafler le fond des micropuits, toute dégradation pouvant entraîner une lecture élevée de l'absorbance.
6. Tenir les compte-gouttes en position verticale de façon à dispenser des gouttes de taille adéquate.
7. Manipuler les échantillons et micropuits utilisés comme tout facteur potentiel de transmission d'agents infectieux. Utiliser des gants pour effectuer les tests.
8. Les réactifs contiennent du thimérosal qui est utilisé en tant que conservateur. Ils doivent donc être manipulés conformément aux consignes données par les laboratoires.
9. La *Solution d'arrêt* contient 0,6 N d'acide sulfurique. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau.
10. Les micropuits non utilisés doivent être réintroduits dans leur emballage refermable contenant un agent de dessiccation pour les protéger de l'humidité.
11. Le lavage doit être réalisé suivant les consignes indiquées afin d'éviter toute réaction hors essai.
12. Une congélation des échantillons (-20°C ou moins) peut leur faire perdre leur activité en raison de gels et dégels multiples.
13. Ne pas congeler les réactifs. Conserver le kit à une température comprise entre 2° et 8°C.
14. Le *Substrat* est photosensible et ne doit pas être directement exposé à la lumière solaire ou à une source de rayons UV.
15. La procédure de test spécifiée permet d'obtenir les meilleurs résultats. Les concentrations, les conditions d'incubation et les spécifications de traitement ont été optimisées de façon à rendre le test sensible et spécifique. Toute modification de la procédure spécifiée et/ou des conditions de test peut altérer la sensibilité et la spécificité du test. Les échantillons de selles normaux contiennent de faibles concentrations de lactoferrine et les dilutions recommandées dans le kit sont conçues pour dépister l'augmentation de lactoferrine par rapport aux concentrations habituelles.

16. Le contrôle positif contient de la lactoferrine qui est un produit humain dérivé. La substance a été testée et a présenté des résultats négatifs pour les anticorps anti-VIH-1, VIH-2, HCV et HbsAg. Aucune méthode de test connue ne garantit l'absence totale d'agents infectieux. L'ENSEMBLE DES PRODUITS HUMAINS DOIVENT ETRE MANIPULES EN TANT QUE PRODUITS POTENTIELLEMENT INFECTIEUX. Un procédé de protection contre les risques biologiques est publié dans le *Manual of Biosafety in Microbiology & Biomedical Laboratories* du CDC/NIH.

PREPARATIONS PRELIMINAIRES

1. Tous les réactifs doivent se trouver à température ambiante avant application dans l'essai.
2. **Préparer la Solution de lavage à 1X.** La *Solution de lavage* est fournie sous forme de concentré à 20X (un précipité peut être observé). Verser 50 ml de concentré dans 950 ml d'eau déionisée pour obtenir un volume total d'un litre. Étiqueter la bouteille. Conserver toute *Solution de lavage* 1X non utilisée à une température comprise entre 2° et 8°C.
3. **Préparer le Diluant 1X.** Le *Diluant* est fourni sous forme de concentré 10X. Verser 40 ml de concentré dans 360 ml d'eau déionisée pour obtenir un volume total de 400 ml. Étiqueter la bouteille. Conserver tout *Diluant* 1X non utilisé à une température comprise entre 2° et 8°C.
4. **Préparation de la microplaque.** Chaque bande contient 8 puits enduits d'anticorps polyclonaux spécifiques de la lactoferrine. Chaque échantillon ou solution de contrôle nécessite un de ces micropuits enduits. Éviter tout contact avec le fond des micropuits, il s'agit de la partie utilisée par les lecteurs ELISA. Les micropuits inutilisés doivent être remis dans le sachet plastique et ce dernier doit être fermé hermétiquement avec l'agent de dessiccation.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS ET PRÉPARATION DE DILUTIONS

REMARQUE : recueillir les échantillons de selles dans un récipient propre et hermétique. Ne pas utiliser des échantillons collectés ou conservés dans 10 % de formol, de formol thimérosol, du formol d'acétate de sodium ou d'alcool polyvinylique. Les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8°C ou à température ambiante jusqu'à 2 semaines après le prélèvement, puis congelés à -20°C ou plus bas. Les échantillons dilués doivent être conservés entre 2 et 8°C pendant 48 heures maximum, après quoi ils seront jetés. **Bien mélanger (mixer) les échantillons avant l'essai.** Ceci inclut le mélange complet de l'échantillon avant de le transférer sur le *Diluant* ainsi que le mélange complet de l'échantillon dilué avant de réaliser l'essai.

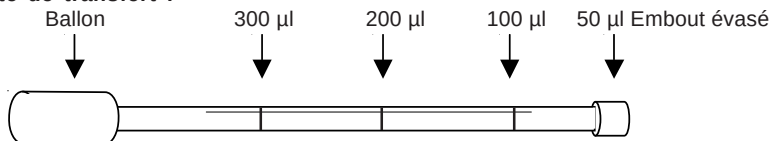
1. Préparer un échantillon dilué.

Pour des échantillons de selles liquides : Préparer deux tubes plastiques pour chaque échantillon à tester. Pour chaque échantillon, ajouter 950 µl de *Diluant 1X* dans chacun des deux tubes. Utiliser une pipette de transfert pour ajouter 50 µl (élément évasé) de l'échantillon de selles liquide dans l'un des tubes et bien mélanger en utilisant un agitateur vortex. Ensuite, transférer 50 µl (partie évasée) de l'échantillon précédemment dilué dans le deuxième tube contenant 950 µl de *Diluant 1X*. Ceci représente une dilution à 1:400 de l'échantillon et seul le deuxième tube doit être utilisé pour le reste du test.

Pour des échantillons de selles formées/solides : Préparer deux tubes plastiques pour chaque échantillon à tester. Pour chaque échantillon, ajouter 950 µl de *Diluant 1X* dans chacun des deux tubes. Utiliser une pipette de transfert pour ajouter 0,05 g (partie évasée) ou peser 0,05 g de l'échantillon fécal et l'ajouter dans le tube contenant le *Diluant* (1:20). Bien mélanger à l'aide d'un agitateur vortex. Ensuite, transférer 50 µl (partie évasée) de l'échantillon précédemment dilué dans le deuxième tube. Ceci représente une dilution à 1:400 de l'échantillon et seul le deuxième tube doit être utilisé pour le reste du test.

- Agiter les tubes pendant 10 secondes et les conserver à une température comprise entre 2° et 8°C jusqu'à réalisation du test. Agiter une fois de plus avant de transférer l'échantillon dilué vers le micropuits. Cette opération garantit un bon mélange de l'échantillon.

Pipette de transfert :



PROCÉDURE DE TEST

Matériel fourni

2 Films adhésifs plastiques

100 pipettes de transfert (élément évasé = 50 µl)

Matériel et équipement nécessaires mais non fournis

Pulvérisateur pour *Solution de lavage* 1X

Agitateur vortex

Réfrigérateur de stockage

Tubes de dilution de l'échantillon

Réceptacle à déchets/Papier absorbant

Incubateur à 37°C ± 2°C

Bouteille de *Diluant* 1X

Eau déionisée ou distillée

Lecteur ELISA capable d'effectuer une lecture à 450 nm ou à 450/620 nm

- Déterminer le nombre de micropuits à utiliser. Ajouter 1 goutte de *Contrôle Positif* (capsule noire) au micropuits de contrôle positif. Utiliser une pipette de transfert pour ajouter 50 µl (partie évasée) de *Diluant* 1X dans un puits de contrôle négatif. Utiliser une pipette de transfert pour ajouter 100 µl (premier repère après la partie évasée) d'échantillon dilué au 1/400 dans un seul puits.
- Incuber les micropuits à 37°C ± 2°C pendant 30 minutes.
- Secouer le contenu hors des micropuits dans un réceptacle à déchets.
- Nettoyer les micropuits en projetant énergiquement la *Solution de lavage* diluée à l'aide d'un pulvérisateur à jet continu vers le fond de chaque micropuits. Remplir les puits, puis secouer la *Solution de lavage* hors du puits dans un réceptacle à déchets. Rabattre la plaque à l'envers sur une serviette en papier sèche et répéter **quatre fois** les étapes de lavage en utilisant une serviette en papier sèche à chaque fois. Si des particules sont visibles dans les micropuits, continuer le lavage jusqu'à disparition complète de ces dernières.
- Ajouter une goutte de *Conjugué* (capsule rouge) dans chaque micropuits. Incuber les micropuits à 37°C ± 2°C pendant 30 minutes.
- Reprendre les étapes #3 et #4. Jeter correctement toutes les serviettes en papier et récipients à échantillons.
- Verser 2 gouttes de *Substrat* (capsule bleue) dans chaque micropuits. Tapoter légèrement sur les micropuits pour mélanger le contenu. Laisser incuber les micropuits à température ambiante pendant 15 minutes. Tapoter légèrement les micropuits 1 à 2 fois pendant la période d'incubation.
- Verser 1 goutte de *Solution d'arrêt* (capsule jaune) dans chaque micropuits. Tapoter légèrement les micropuits et attendre 2 minutes avant d'effectuer la lecture. Lors de l'adjonction de la *Solution d'arrêt*, la couleur bleue vire au jaune. Cette modification peut être quantifiée en mesurant la densité optique à 450 nm sur un lecteur de microplaques ELISA. Essuyer le dessous de chaque micropuits avant de mesurer la densité optique. Pour les lecteurs à double longueur d'onde, effectuer la lecture à 450 nm et se référer à 620 nm. Effectuer la lecture entre deux et dix minutes après l'adjonction de la *Solution d'arrêt*.
- Enregistrer les valeurs d'absorbance pour le contrôle positif, le contrôle négatif et chaque échantillon testé.
- Faire la moyenne des résultats des puits en double avant d'interpréter les résultats.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Les contrôles positif et négatif doivent répondre aux critères suivants, faute de quoi le test est invalide. Le micropuits de contrôle doit être d'aspect jaune. Si la lecture se fait sur un spectrophotomètre, le résultat des DO_{450} et $DO_{450/620}$ doit être supérieur à 0,500. Le contrôle négatif doit être inférieur à 0,200 pour la DO_{450} ou inférieur à 0,160 pour la $DO_{450/620}$. Pour vérifier l'absence de contamination, réitérer le test si un échantillon présente un résultat positif contestable (soit inférieur à 0,400) et se trouve à proximité d'un micropuits dont la positivité est sans conteste.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les mesures doivent être effectuées à 450 nm sur un spectrophotomètre à longueur d'onde unique ou à 450/620 nm sur un spectrophotomètre à longueur d'onde double.

1. Longueur d'onde spectrophotométrique simple à 450 nm

Négatif = $DO_{450} < 0,200$

Positif = $DO_{450} \geq 0,200$

2. Longueur d'onde spectrophotométrique double à 450/620 nm

Négatif = $DO_{450/620} < 0,160$

Positif = $DO_{450/620} \geq 0,160$

Un résultat positif indique que l'échantillon contient des concentrations élevées de lactoferrine.

Un résultat négatif au test indique que l'échantillon ne contient pas un taux élevé de lactoferrine.

DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'expiration du kit est indiquée sur l'étiquette extérieure. La date d'expiration de chaque composant est indiquée sur chaque étiquette. Le kit contenant les réactifs dont la durée de conservation est indiquée doit être conservé à une température comprise entre 2 et 8°C et remis au réfrigérateur aussitôt que possible après utilisation.

EFFICACITÉ DU TEST

71 patients atteints de recto-colite hémorragique, 78 patients souffrant de maladie de Crohn, 31 patients avec syndrome du côlon irritable et 56 sujets sains ont été recrutés dans trois centres de référence en matière de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (un sur la côte Est, et deux dans le Midwest) et à TECHLAB®, Inc. Sur les 40 patients dont la recto-colite hémorragique était active, 35 (88 %) ont été décelés positifs avec le test *IBD-CHEK*®. Sur les 31 patients dont la recto-colite hémorragique était inactive, 16 (52 %) ont été testés positifs avec le test *IBD-CHEK*®. Sur les 52 patients dont la maladie de Crohn était active, 44 (85 %) ont été décelés positifs avec le test *IBD-CHEK*®. Sur les 26 patients souffrant de maladie de Crohn inactive, 16 (62 %) ont été testés positifs. Les 31 patients atteints du syndrome du côlon irritable (100 %) et les 56 sujets sains (100 %) ont été testés négatifs avec le test *IBD-CHEK*®. Les valeurs de distinction entre la MICI active, la recto-colite hémorragique (RCH) active et la maladie de Crohn (MC) active par rapport au syndrome du côlon irritable (SCI) active et aux sujets sains sont présentées dans le tableau suivant.

Valeur	MICI active contre SCI et sujets sains	RCH active contre SCI et sujets sains	MC active contre SCI et sujets sains
Sensibilité	86%	88%	85%
Spécificité	100%	100%	100%
Valeur préd. Pos.	100%	100%	100%
Valeur préd. Neg.	87%	95%	92%
Corrélation	93%	96%	94%

LIMITES DE LA PROCÉDURE

1. Le test *IBD-CHEK*® est un test de dépistage qui détecte les concentrations élevées de lactoferrine libérée par les leucocytes fécaux. Le test peut ne pas être approprié aux personnes immunodéficientes. Les échantillons des patients suivants doivent être exclus du test *IBD-CHEK*® : patients présentant des antécédents de VIH et/ou d'Hépatite B et C, patients présentant une anamnèse de diarrhées infectieuses (au cours des 6 mois précédant le test), et patients ayant souffert d'une colostomie et/ou d'une iléostomie au cours du mois précédant le test.
2. Les dilutions d'échantillons de selles recommandées par la brochure ont été évaluées lors d'essais cliniques et se sont montrées optimales pour les résultats aux tests. L'utilisation de dilutions plus faibles peut entraîner des faux positifs en raison de la présence de taux normaux de lactoferrine. Ainsi, seules les dilutions recommandées dans la brochure doivent être appliquées.
3. À ce jour, le test *IBD-CHEK*® n'a pas été évalué cliniquement pour la détection des leucocytes dans d'autres types d'échantillons cliniques. Utiliser le test uniquement pour l'analyse d'échantillons fécaux.
4. Les échantillons fécaux conservés dans 10 % de formol, de formol thimérol, de formol d'acétate de sodium ou d'alcool polyvinylique ne peuvent pas être utilisés.
5. Les patients atteints de MICI alternent entre des phases actives (inflammatoires) et inactives (non-inflammatoires) de la maladie. Ces phases doivent être prises en compte lors de l'utilisation du test *IBD-CHEK*®.
6. D'autres troubles intestinaux, dont plusieurs infections gastro-intestinales et les cancers colorectaux, provoquent souvent l'augmentation de la lactoferrine dans les échantillons de selles et ces échantillons seront positifs avec le test *IBD-CHEK*®. Le diagnostic de MICI active ne peut donc pas reposer uniquement sur le résultat positif du test *IBD-CHEK*®.

RÉACTIVITÉ CROISÉE

Différents organismes retrouvés dans les intestins ont été examinés afin de détecter une réactivité croisée dans le test *IBD-CHEK*®. L'analyse a porté sur des cultures en milieu liquide mélangées avec le *Diluant* 1X. Les cultures sur milieu liquide utilisées en phase logarithmique contenaient $>10^8$ bactéries par ml. Les organismes n'ayant pas réagi au test *IBD-CHEK*® sont les suivants :

<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Fusobacterium praesnitzii</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Bacteroides distasonis</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Bacteroides eggerthii</i>	<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Clostridium novyi</i>	<i>Shigella enteritidis</i>
<i>Bacteroides stercoris</i>	(types A,B,C)	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacteroides uniformis</i>	(types A,B,C,D,E)	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Clostridium tetani</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Eubacterium aerofaciens</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

EFFET DE LA CONSISTANCE DE L'ÉCHANTILLON DE SELLES

Le test *IBD-CHEK*® a détecté la présence de lactoferrine dans les échantillons de selles solides, semi-solides et liquides, à des taux équivalents à ceux obtenus avec de la lactoferrine purifiée préparée avec le *Diluant* du kit.

REPRODUCTIBILITÉ ET PRÉCISION

La variation inter-essais a été déterminée par l'analyse de 8 échantillons de selles négatifs pour la lactoferrine et 8 échantillons positifs sur une période de 3 jours. Le pourcentage du coefficient de variation (%CV) était de 23,5 % pour les échantillons positifs et 7,4 % pour les échantillons négatifs. La variation intra-essai était déterminée par l'analyse de 12 échantillons de selles, chaque échantillon étant testé 6 fois avec un même lot de kits. L'analyse intra-essai se trouvait dans une fourchette du pourcentage de coefficient de variation de 2,7 à 24 avec une moyenne de 8,7 %.

FOR INFORMATIONAL USE
ONLY

REFERENCES CITED

1. Camilleri, M. 2001. Management of the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 120:652-668.
2. Everhart, J. E. 1994. Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. U.S. Government Printing Office, NIH Publication no. 94-1447.
3. Fine, K. D., F. Ogunji, J. George, M. Niehaus, and R. Guerrant. 1998. Utility of a rapid fecal latex agglutination test detecting the neutrophil protein lactoferrin, for diagnosing inflammatory causes of chronic diarrhea. *Am. J. Gastroenterol.* 93:1300-1305.
4. Guerrant, R.L., V. Araujo, E. Soares, K. Kotloff, A. Lima, W. Cooper, and A. Lee. 1992. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. *J. Clin. Microbiol.* 30:1238-1242.
5. Harris, J. C., H. L. DuPont, and B. R. Hornick. 1971. Fecal leukocytes in diarrheal illness. *Ann. Intern. Med.* 76:697-703.
6. Riley, L. W. 1995. Acute inflammatory diarrhea. In M. Blaser, P. Smith, J. Ravdin, H. Greenberg, and R. Guerrant (ed.), *Infections of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, NY.
7. Sartor, R. B. 1995. Microbial agents in pathogenesis, differential diagnosis, and complications of inflammatory bowel disease. In M. Blaser, P. Smith, J. Ravdin, H. Greenberg, and R. Guerrant (ed.), *Infections of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, NY.
8. Sugi, K., O. Saitoh, I. Hirata, and K. Katsu. 1996. Fecal lactoferrin as a marker for disease activity in inflammatory bowel: comparison with other neutrophil derived proteins. *Am. J. Gastroenterol.* 91:927-934.
9. Uchida, K., R. Matsuse, S. Tomita, K. Sugi, O. Saitoh, and S. Ohshiba. 1994. Immunochemical detection of human lactoferrin in feces as a new marker for inflammatory gastrointestinal disorders and colon cancer. *Clin. Biochem.* 27:259-264.
10. Washington, J. A., and G. V. Doern. 1991. Assessment of new technology. In A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology.