

TECHLAB® LEUKO EZ VUE®

An Immunochromatographic Test for the Qualitative
Detection of Elevated Levels of Fecal Lactoferrin.

Catalog No. T30355 (25 Tests)

IVD *In Vitro* Diagnostic Medical Device

For Canadian Users: For Laboratory Use Only

ESPAÑOL p. 8

Test inmunocromatográfico para la detección cualitativa
de niveles elevados de lactoferrina fecal.

Prod. No. T30355 (25 Pruebas)

IVD Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*

DEUTSCH p. 15

Ein immunochromatographischer Test für den qualitativen
Nachweis erhöhter Lactoferrinkonzentrationen im Stuhl.

Katalognummer T30355 (25 Tests)

IVD *In-Vitro*-Diagnostikum

FRANCAISE p. 22

Dosage immunochromatographique de dépistage qualitatif
de concentrations accrues de lactoferrine fécale.

Numéro de Catalogue T30355 (25 Analyses)

IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

Pour les utilisateurs canadiens:

Pour usage en laboratoire seulement

Made in the USA

Developed and Manufactured by:



TECHLAB®

2001 Kraft Drive

Blacksburg, VA 24060-6358 USA



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

Distributed by:



Alere North America, LLC
30 South Keller Road
Orlando, Florida 32810
TEL 1-877-441-7440
1-321-441-7200 OUTSIDE USA

INTENDED USE

The **LEUKO EZ VUE®** test is an immunochromatographic test for the qualitative detection of elevated levels of fecal lactoferrin, a marker for fecal leukocytes and an indicator of intestinal inflammation. The **LEUKO EZ VUE®** test detects lactoferrin in liquid, semi-solid, and solid fecal specimens. A positive test result indicates an increased level of fecal lactoferrin and warrants additional testing.

EXPLANATION

Diarrheal diseases represent one of the major causes of morbidity throughout the world. Acute diarrheal illness is second only to acute upper respiratory illness in frequency. In developed countries, persons experience one to three illnesses per year on average due to gastrointestinal pathogens, whereas in impoverished countries, the average ranges from five to eighteen illnesses per person. The latter cases are especially important since they lead to high rates of morbidity and death. It has been estimated that more than 12,000 children die each day in Asia, Africa, and Latin America due to diarrheal illnesses (1,2). Diarrheal diseases are caused by different pathogens ranging from viruses (rotaviruses, Norwalk-like viruses, and enteric adenoviruses) to bacteria (enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, and toxigenic *Clostridium difficile*) to parasites (*Cryptosporidium* and *Entamoeba*). Many of these pathogens have only been recognized in the last two decades and the diagnosis is very complicated and expensive.

Diarrheal diseases can be classified into inflammatory and non-inflammatory diarrhea. Non-inflammatory diarrheas include those caused by viruses and most parasites and are, for the most part, effectively treated with simple oral rehydration therapy. Inflammatory diarrheas, on the other hand, tend to be more serious and need to be followed up by more extensive testing. This type of diarrhea is caused by pathogens such as *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium difficile* (3,4). In inflammatory diarrheas, fecal leukocytes are found in feces in large numbers. The determination of fecal leukocytes by microscopy is a procedure used by many clinical laboratories to identify inflammatory diarrheas. However, this method has disadvantages. Microscopy is not standardized and specimens must be examined within minutes of collection to be accurate (5). The test can be difficult to interpret and storage of specimens overnight before examination may result in lower sensitivity due to cell lysis. Some enteric pathogens, such as *Clostridium difficile*, produce toxins that lyse leukocytes and other cells (6). As a result, leukocytes may not be visible late in the infection even though there is severe inflammation. The method of collection also affects the sensitivity of the test. Cup specimens are often hard to collect but they are more sensitive for leukocytes than swab specimens, which tend to destroy the morphology of the leukocytes (7).

The **LEUKO EZ VUE®** overcomes the problems of microscopy by utilizing immunochromatography technology and provides results in 10 minutes. The assay detects elevated levels of lactoferrin in fecal samples. Lactoferrin is very stable and is not degraded during infections by the toxins of pathogens such as *C. difficile* (6).

PRINCIPLE OF THE TEST

The **LEUKO EZ VUE®** test utilizes rabbit anti-lactoferrin antibodies that are conjugated directly to gold particles. The *Membrane Cassette* contains two stripes of immobilized antibodies. One stripe contains anti-lactoferrin antibodies. The other, representing a control stripe, contains anti-IgG antibodies. The diluted sample and gold conjugate migrate by capillary action when the sample is added to the well. If elevated lactoferrin is present in the sample, gold conjugate-lactoferrin complexes form and are captured by the immobilized anti-lactoferrin antibodies in the stripe. The lactoferrin-conjugate-antibody complexes appear as a single red line in the test portion of the *Results Window*. In the control stripe, conjugate binds to the immobilized anti-IgG antibodies, demonstrating correct migration of the sample and conjugate along the membrane. The conjugate-anti-IgG antibodies appear as a single red line in the control portion of the *Results Window*.

REAGENTS

- DIL SPE** **Diluent**, 65 mL (Ready-to-use, contains phosphate-buffered saline, detergent and 0.05% ProClin® 300)
Signal Word: Warning
H317: May cause an allergic skin reaction
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501
- MEM CAS** **Membrane Cassettes**, 25 (1 *Membrane Cassette* per pouch; each membrane is coated with anti-lactoferrin antibodies and contains antibodies conjugated to colloidal gold)
- CONTROL +** **Positive Control**, 3.5 mL (phosphate-buffered saline containing purified human lactoferrin)



Disposable plastic pipettes, 25 (flared section = 50 µL)

Disposable sample preparation devices, 25 (25 tubes and 25 filter tips)

PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents from the kit box should be at room temperature before use.
- The pouch containing *Membrane Cassette* should be opened just before use.
- Keep the *Membrane Cassettes* dry before use.
- Reagents from different kits should not be mixed. Do not use the kit past the expiration date.
- Use the dilution of fecal specimen as recommended in the kit. 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.
- Do not freeze the reagents. The kit should be stored between 2° and 30°C.
- All *Membrane Cassettes* must be read promptly at 10 minutes.
- To minimize the effects of static electricity, place all *Membrane Cassettes* with *Results Window* facing upwards on damp paper towels.
- Specimens that are in transport media or that have been preserved in 10% formalin, Merthiolate Formalin, Sodium Acetate Formalin, Polyvinyl Alcohol, or other fixatives cannot be used.
- 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*.
- Specimens and *Membrane Cassettes* should be handled and disposed of as potential biohazards after use.
- Wear disposable gloves when doing the test.
- The *Diluent* reagent contains 0.05% ProClin® 300 as a preservative. Although the concentration is low, ProClin® 300 is known to be harmful. If skin irritation or rash occurs, get medical advice/attention. Take off contaminated clothing and wash it before reuse. Handle reagents according to existing regulations for laboratory safety and good laboratory practice. Safety Data Sheets for this product are available upon request, contact technical support.
- Follow your national, regional, and local ordinances accordingly for waste disposal regulations.

PRELIMINARY PREPARATIONS

- All reagents must be removed from the kit box and allowed to reach room temperature prior to use in the assay.
- Membrane Cassette preparation.** Each pouch contains 1 *Membrane Cassette* coated with polyclonal antibody specific for lactoferrin. Each specimen or control will require one of these *Membrane Cassettes*. Avoid contact with the membrane located in the *Results Window*.

COLLECTION AND HANDLING OF FECAL SPECIMENS

NOTE: Collect fecal specimens into a clean, airtight container with no preservatives. Specimens should be stored between 2° and 8°C or room temperature for up to 2 weeks from time of collection then stored frozen at -20°C or lower. Diluted specimens should be stored between 2° and 8°C or at room temperature for up to 48 hours then discarded.

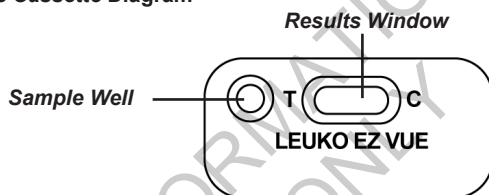
Mix (vortex) specimens thoroughly prior to performing the assay. This includes complete mixing of the specimen prior to transfer to *Diluent* as well as complete mixing of the diluted specimen prior to performing the assay. Specimens that are in transport media or that have been preserved in 10% formalin, Merthiolate Formalin, Sodium Acetate Formalin, Polyvinyl Alcohol, or other fixatives cannot be used.

1. Prepare Diluted Specimen.

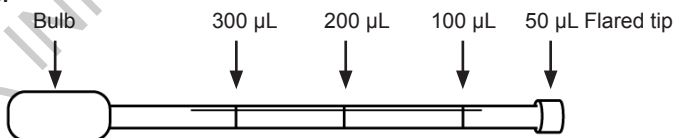
Fecal Specimens: Set up a single plastic tube for each specimen to be tested. For each specimen, add 2.5 mL of *Diluent* to a dilution tube. Use a transfer pipette to add 50 µL (flared section) of liquid fecal specimen. For formed/solid fecal specimens, use a transfer pipette to add 0.05 g (flared section) or weigh 0.05 g of fecal specimen and add to the tube containing *Diluent*. Next, place a filter tip onto the top of the tube containing diluted sample and insert the tip firmly. This represents a 1:50 dilution of the specimen.

- Vortex the tubes for 10 seconds and store between 2° and 8°C until the test is performed. Vortex again before transferring 5 drops of diluted specimen to *Sample Well* indicated in the diagram of the *Membrane Cassette*.

Membrane Cassette Diagram



Transfer Pipette:



PROCEDURE

- Obtain *Membrane Cassettes*. Remove required number of *Membrane Cassettes*, one per specimen, from the foil bags.
- Place *Membrane Cassettes* on damp paper towels with the *Results Window* facing upwards and label cassettes accordingly.
- Holding each diluted specimen tube vertically, dispense **5 drops** (150 µL) into the *Sample Well* of a *Membrane Cassette*. If running external QC, add **3 drops** (150 µL) of *Positive Control* or 150 µL of *Diluent* using the transfer pipette into the *Sample Well* of the cassette. (NOTE: *Diluent* is used as the Negative External QC).
- Incubate each *Membrane Cassette* for 10 minutes at room temperature.
- Read results promptly at 10 minutes: Observe the *Results Window* of each completed *Membrane Cassette* for the appearance of a red line at the "C" control portion and/or "T" test portion of the window. The red line may appear faint to dark in color. (see Interpretation of Results)

INTERPRETATION OF RESULTS

Positive Result: Two red lines are visible, a single red line at the “T” test portion of the *Results Window* and a single red line at the “C” control portion of the *Results Window*, indicating the presence of elevated fecal lactoferrin and a properly reactive control.

Negative Result: A single red line is visible in only the “C” control portion of the *Results Window*. No red line should be visible at the “T” test portion of the *Results Window*, indicating the absence of elevated fecal lactoferrin and a properly reactive control.

Invalid Result: All completed reactions should have a visible red line at the “C” control portion of the *Results Window*. The test is invalid if a control line is not present or if no lines appear on completed *Membrane Cassette*.

QUALITY CONTROL

Internal: A red control line must be visible on the “C” side of the *Results Window* on every *Membrane Cassette* that is tested. The appearance of the red control line confirms that the sample and reagents were added correctly, that the reagents were active at the time of performing the assay, and that the sample migrated properly through the *Membrane Cassette*. A clear background in the result area is considered an internal negative control. If the test had been performed correctly and reagents are working properly, the background will be clear to give a discernible result.

External: The reactivity of the *LEUKO EZ VUE*® test should be verified on receipt using the *Positive Control* and negative control (*Diluent*). The *Positive Control* is supplied with the kit (red-capped bottle). The *Positive Control* confirms the reactivity of the other reagents associated with the assay, and is not intended to ensure precision at the analytical assay cut-off. *Diluent* is used for the negative control.

Additional tests including External Controls should be performed to meet the requirements of local, state and/or federal regulations and/or accrediting organizations.

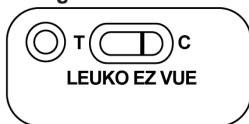
The reactions expected with the external controls are described in the section on INTERPRETATION OF RESULTS. The test should not be used if control tests do not produce the correct results. Proper results obtained with the internal control line, the *Positive Control* and negative control (*Diluent*) serve as indicators that the test was performed correctly, that the antibodies striped on the membrane and the *Conjugate* are active at the time of testing, and that the cassette supports proper sample flow. Failure of the internal and external controls to produce the expected results suggests the test was not performed correctly (i.e., incorrect volume of reagents added, incorrect incubation temperature or times used, or that reagents were not brought to room temperature prior to testing). Repeat the control tests as the first step in determining the cause of the failure.

VISUAL INTERPRETATION OF RESULTS

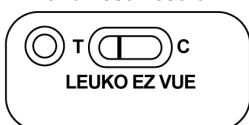
Positive Test Result



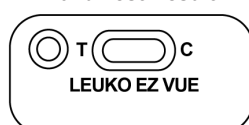
Negative Test Result



Invalid Test Result



Invalid Test Result



SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date of the kit is given on the outside of the box. Expiration dates for each component are listed on the individual labels. The kit containing the reagents should be stored between 2° and 30°C (refrigerated or room temperature). *Membrane Cassettes* should be kept in the sealed pouches until used.

EXPECTED VALUES

The prevalence of a positive test result using the *LEUKO EZ VUE*® in clinical investigations ranged between 27% - 53%. The prevalence will vary from location to location and hospitals may experience rates lower or higher than those observed at the sites used in the *LEUKO EZ VUE*® evaluation. The prevalence will vary depending on the incidence of outbreaks due to various enteropathogens.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

When comparing the *LEUKO EZ VUE*® to the *LEUKO-TEST* in clinical studies, the *LEUKO EZ VUE*® test had positive, negative, and overall agreements of 93%, 80%, and 83%, respectively. Individual results are shown in the Table 1.

Table 1. Comparison of the *LEUKO EZ VUE*® with the *LEUKO-TEST*.

<i>LEUKO EZ VUE</i> ® vs <i>LEUKO-TEST</i> (N=375)	<i>LEUKO-TEST</i> Positive	<i>LEUKO-TEST</i> Negative	Total
<i>LEUKO EZ VUE</i> ® Positive	98	55	153
<i>LEUKO EZ VUE</i> ® Negative	7	215	222
Total	105	270	375

95% Confidence Intervals		
Percent Positive Agreement	93%	86% - 97%
Percent Negative Agreement	80%	74% - 84%
Overall Percent Agreement	83%	80% - 86%

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The *LEUKO EZ VUE*® test detects elevated levels of lactoferrin released from fecal leukocytes as a marker of intestinal inflammation. The test may not be appropriate in immunocompromised persons.
2. The 1:50 dilution of fecal specimen recommended in the brochure has been evaluated in clinical trials and found to be optimal for fecal dilutions. The use of lower dilutions may result in positive reactions due to the presence of normal lactoferrin levels. Therefore, only the dilution recommended in the brochure should be used.
3. At this time, the *LEUKO EZ VUE*® test has not been clinically evaluated for detecting leukocytes in other types of clinical specimens.
4. The intensity of a positive sample test line does not indicate the amount of lactoferrin or severity of disease.
5. Fecal samples from breast fed infants should not be used with this assay.

CROSS-REACTIVITY

Various intestinal organisms were examined for cross-reactivity in the *LEUKO EZ VUE*[®] test. For the analysis, broth cultures mixed 1:50 with 1X *Diluent* were evaluated. Broth cultures at log phase containing $\geq 10^8$ bacteria per mL were used. No cross-reactivity was observed with any of the microbial organisms listed in Table 2.

Table 2. Microbial organisms tested in the *LEUKO EZ VUE*[®] test.

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

Adenovirus type 1 (ATCC #VR-1)	Adenovirus type 2 (ATCC #VR-846)
Adenovirus type 3 (ATCC #VR-3)	Adenovirus type 5 (ATCC #VR-5)
Adenovirus type 40 (ATCC #VR-931)	Human coronavirus (ATCC #VR-740)
Enterovirus type 70 (VR-836)	Coxsackievirus B2 (VR-29)
Coxsackievirus B2 (VR-30)	Coxsackievirus B2 (VR-184)
Coxsackievirus B2 (VR-185)	Echovirus 18 (VR-48)
Echovirus 33 (VR-582)	Enterovirus type 70 (VR-784)

EFFECT OF FECAL SAMPLE CONSISTENCY

The *LEUKO EZ VUE*[®] test detects lactoferrin in liquid, semi-solid, and solid fecal specimens.

REPRODUCIBILITY AND PRECISION

The inter-assay variation was determined by analyzing 7 lactoferrin-negative and 13 lactoferrin-positive fecal specimens over a 3-day period. There was 100% correlation for both the positive specimens and negative specimens including samples close to the cut-off of the kit. The intra-assay variation was determined by analyzing 19 fecal specimens using 6 replicates in a single kit lot. There was a 100% correlation between results for the intra-assay analysis.

INTERFERING SUBSTANCES

The following substances had no effect on test results when present in feces in the concentrations indicated: mucin (5% w/v), serum containing lipid (fecal fats, 5% v/v), Mylanta[®] (5% v/v), Pepto-Bismol[®] (5% v/v), Imodium[®] (5% v/v), Kaopectate[®] (5% v/v), Bilirubin (5% w/v), Hemoglobin (10 mg/g feces).

USO INDICADO

El test **LEUKO EZ VUE®** es un análisis inmunocromatográfico para la detección cualitativa de niveles elevados de lactoferrina fecal, un marcador de leucocitos fecales y un indicador de inflamación intestinal. El test **LEUKO EZ VUE®** detecta lactoferrina en muestras fecales sólidas, semisólidas y líquidas. Un resultado positivo del test indica un nivel elevado de lactoferrina fecal y requiere confirmación con pruebas adicionales.

FUNDAMENTO

Las enfermedades diarreicas son una de las causas principales de morbilidad en todo el mundo. En cuanto a frecuencia, la enfermedad diarreica aguda sólo se encuentra detrás de la enfermedad respiratoria aguda. Las personas de los países desarrollados experimentan, por término medio, entre uno y tres episodios al año causados por patógenos gastrointestinales, mientras que en los países pobres, el número medio oscila entre cinco y dieciocho episodios por persona. Estos últimos casos son especialmente importantes porque conducen a tasas elevadas de morbilidad y mortalidad. Se ha calculado que más de 12.000 niños mueren cada día en Asia, África y Latinoamérica debido a enfermedades diarreicas (1,2). Las enfermedades diarreicas están causadas por diferentes patógenos, desde virus (rotavirus, virus de tipo Norwalk y adenovirus entéricos) a bacterias (*Escherichia coli* enterotoxigénica, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Clostridium difficile* toxigénico) y parásitos (*Cryptosporidium* y *Entamoeba*). Muchos de estos patógenos sólo se conocen desde hace dos décadas y el diagnóstico es muy complicado y costoso.

Las enfermedades diarreicas se han clasificado en diarreas inflamatorias y no inflamatorias. Las diarreas no inflamatorias son las causadas por virus y por la mayoría de los parásitos y, en la mayor parte de los casos, se tratan de forma eficaz simplemente con rehidratación oral. Por el contrario, las diarreas inflamatorias tienden a ser más graves y requieren seguimiento con evaluaciones más exhaustivas. Este tipo de diarrea está causado por patógenos como *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* y *Clostridium difficile* (3,4). En las diarreas inflamatorias se detecta un número elevado de leucocitos en heces. La determinación de leucocitos fecales mediante microscopía es un procedimiento utilizado por muchos laboratorios clínicos para identificar las diarreas inflamatorias. Sin embargo, este método presenta desventajas. La microscopía no es un método normalizado y las muestras deben ser examinadas pocos minutos después de su recogida para que los resultados sean exactos (5). La prueba puede ser difícil de interpretar y la conservación de las muestras durante la noche antes de su evaluación puede reducir la sensibilidad debido a la lisis celular. Algunos enteropatógenos, como *Clostridium difficile*, producen toxinas que destruyen los leucocitos y otras células (6). El resultado es que puede que no se visualicen leucocitos en etapas tardías de la infección aunque exista inflamación intensa. El método de obtención también afecta a la sensibilidad de la prueba. Las muestras procedentes de recipientes de recogida suelen ser más difíciles de obtener pero su sensibilidad a los leucocitos es mayor que la de las muestras transferidas con torunda, en las que existe una tendencia a la destrucción de la morfología de los leucocitos (7).

Con el test **LEUKO EZ VUE®** se resuelven los problemas de la microscopía al utilizar la tecnología de la inmunocromatografía y además aporta resultados en 10 minutos. La prueba detecta niveles elevados de lactoferrina en muestras fecales. La lactoferrina es muy estable y no se degrada durante las infecciones por las toxinas de patógenos como *C. difficile* (6).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

En el test **LEUKO EZ VUE®** se utilizan anticuerpos de conejo frente a lactoferrina que se conjugan directamente con partículas de oro. El *cassette de membrana* contiene dos bandas de anticuerpos inmovilizados. Una banda contiene anticuerpos frente a lactoferrina. La otra, que es una banda de control, contiene anticuerpos frente a IgG. La muestra diluida y el conjugado de oro migran por capilaridad cuando se añade la muestra al pocillo. Si la muestra contiene una cantidad elevada de lactoferrina, se forman complejos de

lactoferrina-conjugado de oro que son capturados por los anticuerpos inmovilizados frente a lactoferrina presentes en la banda. Los complejos lactoferrina-conjugado-anticuerpo aparecen como una línea roja única en la zona de análisis de la *Ventana de Resultados*. En la banda de control, el conjugado se une a los anticuerpos inmovilizados frente a IgG, demostrando la migración correcta de la muestra y del conjugado por la membrana. Los complejos conjugado-anticuerpos frente a IgG aparecen como una línea roja única en la zona de control de la *Ventana de Resultados*.

REACTIVOS

DIL | SPE **Diluyente**, 65 ml (listo para usar, contiene suero fisiológico tamponado con fosfato, detergente y ProClin® 300 al 0,05%)

Palabra de advertencia: Advertencia

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501



MEM | CAS

Cassettes de Membrana, 25 (1 *Cassette de Membrana* por bolsa; cada membrana está recubierta con anticuerpos frente a lactoferrina y contiene anticuerpos conjugados con oro coloidal)

CONTROL | +

Control Positivo, 3,5 ml (suero fisiológico tamponado con fosfato que contiene lactoferrina humana purificada)

Pipetas de plástico desechables, 25 (sección ancha = 50 µl)

Dispositivos desechables para la preparación de la muestra, 25 (25 tubos y 25 puntas con filtro)

PRECAUCIONES

1. Exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Los reactivos de la caja del kit estarán a temperatura ambiente antes de su uso.
3. La bolsa que contiene el *Cassette de Membrana* debe abrirse inmediatamente antes del uso.
4. Mantenga secos los *Cassettes de Membrana* antes del uso.
5. No deben mezclarse los reactivos de kits diferentes. No utilizar los kits después de la fecha de caducidad.
6. Utilice la dilución de la muestra fecal recomendada en el kit. 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 basales.
7. No congelar los reactivos. El kit debe conservarse a una temperatura entre 2 °C y 30 °C.
8. Todos los *Cassettes de Membrana* deben leerse puntualmente a los 10 minutos.
9. Para reducir al mínimo los efectos de la electricidad estática, coloque todos los *Cassettes de Membrana* con la *Ventana de Resultados* mirando hacia arriba sobre toallitas de papel húmedas.
10. No se pueden utilizar las muestras conservadas en medios de transporte o en formol al 10%, formol mertiolado, acetato sódico-formol, alcohol polivinílico u otros fijadores.
11. El *Control Positivo* contiene lactoferrina, un material de origen humano. El material ha sido analizado y es negativo para los anticuerpos frente al 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.
12. Las muestras y los *Cassettes de Membrana* deben manipularse y eliminarse después del uso como materiales biológicos potencialmente peligrosos.
13. Utilice guantes desechables para realizar el test.
14. El reactivo *Diluyente* contiene ProClin® 300 al 0,05% como conservante. Aunque la concentración es baja, se sabe que ProClin® 300 es nocivo. En caso de irritación o

erupción cutánea, consultar a un médico. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Manejar los reactivos de acuerdo con las normas existentes de seguridad de laboratorio y buenas prácticas de laboratorio. Se dispone de fichas de datos de seguridad de este producto bajo pedido, consultar al soporte técnico.

15. Siga las normas nacionales, regionales y locales para consultar los reglamentos de eliminación de residuos.

PREPARACIONES PRELIMINARES

1. Extraiga todos los reactivos de la caja del kit y permita que alcancen la temperatura ambiente antes de su uso en el análisis.
2. **Preparación del *Cassette de Membrana*.** Cada bolsa contiene 1 *Cassette de Membrana* recubierto de anticuerpo policlonal específico frente a lactoferrina. Se utilizará uno de estos *Cassettes de Membrana* para cada muestra o control. Evite el contacto con la membrana situada en la *Ventana de Resultados*.

RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS FECALES

NOTA: Recoja las muestras fecales en un recipiente hermético limpio sin conservantes. 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 el momento de la 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 o a temperatura ambiente 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. No se pueden utilizar las muestras conservadas en medios de transporte o en formol al 10%, formol mertiolado, acetato sódico-formol, alcohol polivinílico u otros fijadores.**

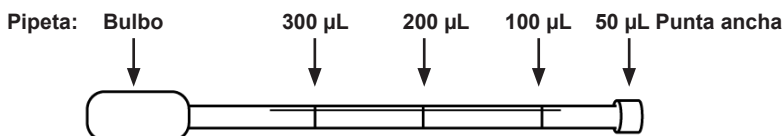
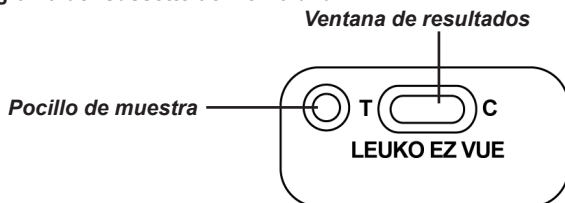
1. **Preparación de la muestra diluida.**

Muestras fecales: Asignar un único tubo de plástico para cada muestra que se vaya a analizar. Para cada muestra, añadir 2,5 ml de *Diluyente* al tubo de dilución. Utilizar una pipeta para añadir 50 µl (sección ancha) de la muestra fecal líquida. Para muestras fecales con forma/sólidas, 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*.

A continuación, coloque una punta con filtro en la parte superior del tubo que contiene la muestra diluida y fíjela con firmeza. Esto equivale a una dilución 1:50 de la muestra.

2. Mezclar con un vórtex los tubos durante 10 segundos y almacenarlos a una temperatura entre 2 y 8 °C hasta que realice el análisis. Volver a mezclar en un vórtex antes de transferir 5 gotas de la muestra diluida al *pocillo de muestra* indicado en el diagrama del *Cassette de Membrana*.

Diagrama del *Cassette de Membrana*



PROCEDIMIENTO

1. Consiga los *Cassettes de Membrana*. Extraiga el número especificado de *Cassettes de Membrana*, uno por muestra, de las bolsas de papel de aluminio.
2. Sitúe los *Cassettes de Membrana* sobre toallitas de papel húmedas con la *Ventana de Resultados* mirando hacia arriba e identifique los cassettes.
3. Sostenga verticalmente cada tubo con la muestra diluida y dispense **5 gotas** (150 µl) en el *Pocillo de Muestra* de un *Cassette de Membrana*. Si se realiza un control de calidad externo deben añadirse al *pocillo de muestra* del cassette **3 gotas** (150 µl) del control positivo o 150 µl de *Diluyente* con la pipeta. (NOTA: el *Diluyente* es el control de calidad externo negativo)
4. Incube cada *Cassette de Membrana* durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Lea los resultados puntualmente a los 10 minutos: observe en la *Ventana de Resultados* de cada *Cassette de Membrana* completado la presencia de una línea roja en la zona del control "C" y/o en la zona de análisis "T" de la ventana. El color de la línea roja puede ser débil o intenso. (Véase el apartado "Interpretación de los resultados").

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Resultado positivo: Se observan dos líneas rojas, una única línea roja en la zona de análisis "T" de la *Ventana de Resultados* y una única línea roja en la zona de control "C" de la *Ventana de Resultados*, que indican la presencia de un nivel elevado de lactoferrina fecal y un control del reactivo apropiado.

Resultado negativo: Sólo se observa una única línea roja en la zona de control "C" de la *Ventana de Resultados*. No se debe observar ninguna línea roja en la zona de análisis "T" de la *Ventana de Resultados*, lo que indica la ausencia de un nivel elevado de lactoferrina fecal y un control del reactivo apropiado.

Resultado no válido: Todas las reacciones completadas deben tener una línea roja visible en la zona de control "C" de la *Ventana de Resultados*. El test no es válido si no aparece una línea de control o si no aparece ninguna línea en un *Cassette de Membrana* completado.

CONTROL DE CALIDAD

Interno: Se debe visualizar una línea de color rojo en el lado "C" de la *Ventana de Resultados* de todos los *Cassettes de Membrana* analizados. La aparición de la línea azul de control confirma que se han añadido correctamente la muestra y los reactivos, que los reactivos estaban activos durante la realización del análisis y que la mezcla ha migrado adecuadamente a través del *Cassette de Membrana*. Un fondo transparente en el área de resultados se considera como un control negativo interno. Si el test se ha realizado adecuadamente y los reactivos funcionan correctamente, el fondo será transparente para dar un resultado apreciable.

Externo: Verifique la reactividad de la prueba *LEUKO EZ VUE®* en el momento de la entrega utilizando el *Control Positivo* y el control negativo (*Diluyente*). El *Control Positivo* se suministra con el kit (frasco con tapón rojo). El *Control Positivo* se utiliza para verificar la reactividad de los demás reactivos del ensayo y su objetivo no es asegurar la precisión del punto de corte del ensayo. El *Diluyente* se utiliza para el control negativo.

Deben realizarse tests adicionales con los controles externos para cumplir los requisitos administrativos locales, regionales o federales y/o los de los organismos de acreditación.

Los resultados de los controles se describen en el apartado INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS. El test no debe utilizarse si en los controles no se obtienen los resultados correctos. El resultado correcto en la línea de control interno, el *Control Positivo* y el control negativo (*Diluyente*) indican que el test se ha realizado correctamente, que los anticuerpos de la banda de la membrana y del *conjugado* estaban activos cuando se realizó el ensayo y que el flujo de la muestra en el cassette fue adecuado. Un resultado incorrecto de los controles internos y externos indica que el test no se realizó de la forma adecuada (es decir, se añadió un volumen incorrecto de los reactivos, la temperatura o los tiempos

de incubación no fueron adecuados o los reactivos no alcanzaron la temperatura ambiente antes de realizar el test). Para determinar la causa del error del test, en primer lugar deben repetirse los tests de control.

INTERPRETACIÓN VISUAL DE LOS RESULTADOS

Resultado positivo del test



Resultado negativo del test



Resultado no válido del test



Resultado no válido del test



PERÍODO DE VALIDEZ Y CONSERVACIÓN

La fecha de caducidad del kit se indica en el exterior de la caja. Las fechas de caducidad de cada componente se indican en las etiquetas individuales. El kit que contiene los reactivos debe conservarse a entre 2 °C y 30 °C (refrigerado o a temperatura ambiente). Los *Cassettes de Membrana* deben conservarse en las bolsas selladas hasta el uso.

VALORES ESPERADOS

La prevalencia de un resultado positivo del test *LEUKO EZ VUE*® en investigaciones clínicas osciló entre el 27% y el 53%. La prevalencia variará de un lugar a otro, y es posible que los hospitales presenten tasas inferiores o superiores a las observadas en los centros en los que se realizó la evaluación de *LEUKO EZ VUE*®. La prevalencia variará dependiendo de la incidencia de los brotes debidos a los diferentes enteropatógenos.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Cuando se han comparado los tests *LEUKO EZ VUE*® y *LEUKO-TEST* en estudios clínicos, el test *LEUKO EZ VUE*® mostró una concordancia positiva, negativa y global del 93%, 80% y 83%, respectivamente. Los resultados individuales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de *LEUKO EZ VUE*® con *LEUKO-TEST*.

<i>LEUKO EZ VUE</i> ® frente <i>LEUKO-TEST</i> (N=375)	<i>LEUKO-TEST</i> Positivo	<i>LEUKO-TEST</i> Negativo	Total
<i>LEUKO EZ VUE</i> ® Positivo	98	55	153
<i>LEUKO EZ VUE</i> ® Negativo	7	215	222
Total	105	270	375

Intervalos de confianza del 95%		
Concordancia positiva	93%	86% - 97%
Concordancia negativa	80%	74% - 84%
Concordancia global	83%	80% - 86%

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El test *LEUKO EZ VUE*® detecta niveles elevados de lactoferrina liberada por los leucocitos fecales como marcador de la inflamación intestinal. Es posible que la prueba no sea adecuada en personas inmunocomprometidas.
2. La dilución 1:50 de la muestra fecal recomendada en el folleto se ha evaluado en estudios clínicos y se ha determinado que es óptima para muestras fecales. El uso de diluciones menores puede generar reacciones positivas debido a la presencia de niveles normales de lactoferrina. Por tanto, sólo debe utilizarse la dilución recomendada en el folleto.
3. Hasta este momento no se ha evaluado clínicamente la detección de leucocitos en otros tipos de muestras clínicas con el test *LEUKO EZ VUE*®.
4. La intensidad de una línea positiva en la línea del análisis no indica la cantidad de lactoferrina ni la gravedad de la enfermedad.
5. En este análisis no deben utilizarse muestras fecales de neonatos alimentados con lactancia materna.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se ha evaluado la reactividad cruzada de diferentes microorganismos intestinales con el test *LEUKO EZ VUE*®. En el análisis se evaluaron cultivos de caldo mixtos (1:50) con *Diluyente* 1x. Se utilizaron cultivos de caldo en fase logarítmica que contenían $\geq 10^8$ bacterias por ml. No se observó reactividad cruzada con ninguno de los microorganismos citados en la Tabla 2.

Tabla 2. Microorganismos analizados en la prueba *LEUKO EZ VUE*®.

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

Adenovirus type 1 (ATCC #VR-1)	Adenovirus type 2 (ATCC #VR-846)
Adenovirus type 3 (ATCC #VR-3)	Adenovirus type 5 (ATCC #VR-5)
Adenovirus type 40 (ATCC #VR-931)	Human coronavirus (ATCC #VR-740)
Enterovirus type 70 (VR-836)	Coxsackievirus B2 (VR-29)
Coxsackievirus B2 (VR-30)	Coxsackievirus B2 (VR-184)
Coxsackievirus B2 (VR-185)	Echovirus 18 (VR-48)
Echovirus 33 (VR-582)	Enterovirus type 70 (VR-784)

EFFECTO DE LA CONSISTENCIA DE LA MUESTRA FECAL

El test *LEUKO EZ VUE*® detecta lactoferrina en muestras fecales sólidas, semisólidas y líquidas.

REPRODUCIBILIDAD Y PRECISIÓN

Se determinó la variación interanalítica analizando 7 muestras fecales con resultado negativo para lactoferrina y 13 muestras fecales con resultado positivo para lactoferrina durante un periodo de 3 días. Se observó una correlación del 100% en las muestras positivas y en las muestras negativas, incluidas las muestras con un resultado próximo al valor del corte del kit. La variación intranalítica se determinó analizando 19 muestras fecales utilizando 6 repeticiones con kits de un único lote. Se observó una correlación del 100% entre los resultados del análisis intraanalítico.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias no influyeron en los resultados del test cuando se encontraban presentes en las heces en las concentraciones indicadas: mucina (5% p/v), suero con líquidos (grasas fecales, 5% v/v), Mylanta® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), bilirrubina (5% p/v), hemoglobina (10 mg/g heces).

FOR INFORMATIONAL USE
ONLY

VERWENDUNGSZWECK

Der **LEUKO EZ VUE®** Test ist ein immunochromatographischer Test für den qualitativen Nachweis erhöhter Lactoferrinkonzentrationen, einem Marker für Leukozyten im Stuhl und Indikator für Darmentzündung. Der **LEUKO EZ VUE®** Test weist Lactoferrin in flüssigen, halbfesten und festen Stuhlproben nach. Ein positives Testergebnis weist auf eine erhöhte Lactoferrinkonzentration im Stuhl hin und erfordert zusätzliche Tests.

ERKLÄRUNG

Durchfallerkrankungen stellen eine der häufigsten Morbiditätsursachen weltweit dar. Akute Durchfallerkrankung tritt am zweithäufigsten nach akuter Erkrankung der oberen Atemwege auf. In den Industrieländern leiden Menschen durchschnittlich jährlich an einer bis drei Erkrankungen aufgrund gastrointestinaler Krankheitserreger. In Entwicklungsländern liegt der Durchschnitt bei 5 bis 18 Erkrankungen pro Person. Letztere Fälle sind von besonderer Bedeutung, da sie zu hohen Morbiditäts- und Todesraten führen. Schätzungen gehen davon aus, dass mehr als 12.000 Kinder jährlich in Asien, Afrika und Lateinamerika an Durchfallerkrankungen sterben (1,2). Durchfallerkrankungen werden von verschiedenen Krankheitserregern verursacht, angefangen von Viren (Rotaviren, Noroviren und enterale Adenoviren) über Bakterien (enterotoxigene *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* und toxische *Clostridium difficile*) bis zu Parasiten (*Cryptosporidium* und *Entamoeba*). Viele dieser Krankheitserreger wurden erst im Laufe der letzten beiden Jahrzehnte erkannt, und die Diagnose ist äußerst kompliziert und kostspielig.

Durchfallerkrankungen werden in entzündliche und nicht entzündliche Diarrhoen unterteilt. Nicht entzündliche Diarrhoen werden von Viren und den meisten Parasiten verursacht und sind in den meisten Fällen mit einer einfachen oralen Rehydrations-therapie erfolgreich behandelbar. Im Gegenteil dazu sind entzündliche Diarrhoen ernster und erfordern komplexere Untersuchungen. Dieser Diarrhoe-Typ wird von Krankheitserregern wie *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* und *Clostridium difficile* verursacht (3,4). Bei entzündlichen Diarrhoen sind hohe Leukozytenkonzentrationen im Stuhl vorhanden. Die Bestimmung der Leukozytenkonzentration im Stuhl mittels Mikroskop ist ein Verfahren, das in zahlreichen klinischen Labors für den Nachweis von entzündlicher Diarrhoe eingesetzt wird. Dieses Verfahren hat jedoch gewisse Nachteile. Mikroskopie ist kein standardisiertes Verfahren, und für eine präzise Analyse müssen die Proben innerhalb von Minuten nach der Entnahme untersucht werden. Die Interpretation des Tests kann sich als schwierig gestalten und eine Lagerung der Proben über Nacht vor der Untersuchung kann aufgrund von Zelllyse zu geringerer Sensitivität führen. Einige enterale Krankheitserreger, wie etwa *Clostridium difficile*, produzieren Toxine, die Leukozyten und andere Zellen lysieren (6). Daher sind Leukozyten möglicherweise im Spätstadium der Infektion nicht sichtbar, auch wenn es sich um eine schwere Entzündung handelt. Überdies beeinträchtigt das Probenentnahmeverfahren die Sensitivität des Tests. Becherproben sind oft schwer zu sammeln, dafür jedoch empfindlicher für Leukozyten als Abstriche, welche die Morphologie der Leukozyten leicht zerstören können (7).

Der **LEUKO EZ VUE®** umgeht die Probleme der Mikroskopie mittels Einsatz der Immunochromatographie-Technologie und liefert Ergebnisse in 10 Minuten. Der Test weist erhöhte Lactoferrinkonzentrationen in Stuhlproben nach. Lactoferrin ist äußerst stabil und wird während einer Infektion nicht von den Toxinen pathogener Keime wie *C. difficile* abgebaut (6).

TESTPRINZIP

Der **LEUKO EZ VUE®** Test basiert auf Anti-Lactoferrin-Antikörpern (Kaninchen), die direkt an Goldpartikel konjugiert sind. Die *Membrankassetten* verfügen über zwei Streifen mit immobilisierten Antikörpern. Ein Streifen enthält Anti-Lactoferrin-Antikörper. Der zweite, der als Kontrollstreifen dient, enthält Anti-IgG-Antikörper. Die verdünnte Probe und das Goldkonjugat migrieren mittels Kapillarkwirkung, wenn die Probe in die Kavität gegeben wird. Ist erhöhtes Lactoferrin in der Probe vorhanden, so bilden sich Goldkonjugat-

Lactoferrin-Komplexe, die von den immobilisierten Anti-Lactoferrin-Antikörpern auf dem Streifen eingefangen werden. Die Lactoferrin-Konjugat-Antikörper-Komplexe erscheinen als einzelne rote Linie im Testbereich des *Ergebnisfensters*. Auf dem Kontrollstreifen bindet Konjugat an die immobilisierten Anti-IgG-Antikörper, was auf eine korrekte Migration der Probe und des Konjugats entlang der Membran hinweist. Die Konjugat-Anti-IgG-Antikörper erscheinen als einzelne rote Linie im Kontrollbereich des *Ergebnisfensters*.

REAGENZIEN

- DIL | SPE** **Verdünnungspuffer**, 65 ml (gebrauchsfertig, enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Detergenz und 0,05 % ProClin® 300)
Signalwort: Warnung 
H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501
- MEM | CAS** **Membrankassetten**, 25 (1 *Membrankassette* pro Beutel; jede Membran ist mit Anti-Lactoferrin-Antikörpern beschichtet und enthält an kolloidales Gold konjugierte Antikörper)
- CONTROL | +** **Positive Kontrolle**, 3,5 ml (phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit gereinigtem menschlichem Lactoferrin).
- Einweg-Kunststoffpipetten**, 25 (konisch erweiterter Bereich = 50 µl)
Einweg-Vorrichtungen für Probenvorbereitung, 25 (25 Reagenzröhrchen und 25 Filterspitzen)

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Nur für die *In-Vitro*-Diagnostik.
2. Die Reagenzien aus dem Kit müssen vor Gebrauch Raumtemperatur annehmen.
3. Der Beutel mit der *Membrankassette* darf erst unmittelbar vor dem Gebrauch geöffnet werden.
4. *Membrankassetten* vor Gebrauch trocken lagern.
5. Reagenzien aus verschiedenen Kits nicht mischen. Verwenden Sie das Kit nicht nach dem Verfallsdatum.
6. Verwenden Sie die im Kit empfohlene Probenverdünnung. Normale Stuhlproben beinhalten niedrige Lactoferrinkonzentrationen. Die im Kit empfohlenen Verdünnungen sind für den Nachweis eines Lactoferrinanstiegs über Hintergrundkonzentrationen vorgesehen.
7. Reagenzien nicht einfrieren. Das Kit muss zwischen 2° und 30 °C gelagert werden.
8. Alle *Membrankassetten* müssen unmittelbar nach 10 Minuten abgelesen werden.
9. Um elektrostatische Effekte zu minimieren, legen Sie alle *Membrankassetten* mit dem Reaktionsfenster nach oben auf feuchte Papiertücher.
10. Proben aus Transportmedien oder die in 10% Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol oder anderen Fixativa konserviert wurden, dürfen nicht verwendet werden.
11. Die *positive Kontrolle* enthält Lactoferrin aus 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.
12. Proben und *Membrankassetten* nach dem Gebrauch als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandeln und entsorgen.
13. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Einweghandschuhe.
14. Das *Verdünnungspuffer*-Reagenz enthält 0,05 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel. Auch wenn die Konzentration gering ist, ist ProClin® 300 als schädlich bekannt. Bei Hautreizung oder -rötung, ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Reagenzien gemäß vorhandenen Vorschriften für die Laborsicherheit und gute Laborpraxis behandeln. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Nachfrage erhältlich. Wenden Sie sich an den technischen Support.

15. Befolgen Sie Ihre nationalen, regionalen und lokalen Verordnungen in Bezug auf die Abfallentsorgung.

VORBEREITUNGEN

1. Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung aus der Packung genommen werden und Raumtemperatur angenommen haben.
2. **Vorbereitung der Membrankassette.** Jeder Beutel enthält 1 *Membrankassette*, die mit Lactoferrin-spezifischem polyklonalem Antikörper beschichtet ist. Für jede Probe bzw. Kontrolle ist eine dieser *Membrankassetten* erforderlich. Vermeiden Sie eine Berührung der Membran im *Ergebnisfenster*.

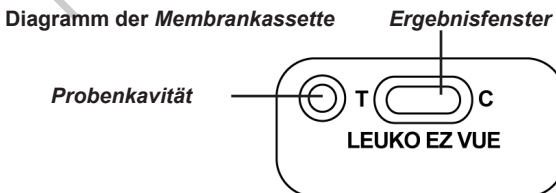
ENTNAHME UND HANDHABUNG DER STUHLPROBEN

BITTE BEACHTEN: Sammeln Sie die Stuhlproben in einem sauberen, luftdichten Behälter ohne Konservierungsstoffe. Lagern Sie die Proben zwischen 2-8°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 bzw. bei Raumtemperatur 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. Proben aus Transportmedien oder die in 10% Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol oder anderen Fixativa konserviert wurden, dürfen nicht verwendet werden.**

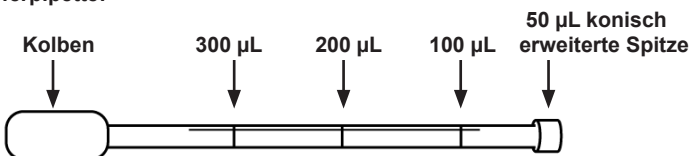
1. **Zubereitung der verdünnten Proben.**

Stuhlproben: Bereiten Sie für jede zu testende Probe ein Kunststoffreagenzröhrchen vor. Geben Sie für jede Probe 2,5 ml *Verdünnungspuffer* in ein Verdünnungsreagenzröhrchen. Geben Sie mithilfe einer Transferpipette 50 µl (konisch erweiterter Bereich) der flüssigen Stuhlprobe. Feste Stuhlproben: Geben Sie mithilfe einer Transferpipette (konisch erweiterter Bereich) oder mittels Abwiegen 0,05 g Stuhlprobe in das Reagenzröhrchen mit dem *Verdünnungspuffer*. Nun setzen Sie eine Filterspitze auf das Reagenzröhrchen mit der verdünnten Probe und stecken die Spitze fest ein. Dies stellt eine 1:50 Verdünnung der Stuhlprobe dar.

2. Vortexen Sie die Reagenzröhrchen 10 Sekunden und lagern Sie diese bis zur Testdurchführung zwischen 2 °C und 8 °C. Vortexen Sie nochmals, bevor Sie 5 Tropfen der verdünnten Stuhlprobe in die im Diagramm der *Membrankassette* angezeigte *Probenkavität* übertragen.



Transferpipette:



VERFAHREN

1. Nehmen Sie die *Membrankassetten* zur Hand. Nehmen Sie die erforderliche Anzahl an *Membrankassetten* – eine pro Probe – aus den Folienbeuteln.
2. Legen Sie die *Membrankassetten* mit dem *Ergebnisfenster* nach oben auf feuchte Papiertücher, und beschriften Sie die Kassetten ordnungsgemäß.
3. Halten Sie die Reagenzröhrchen mit den verdünnten Proben senkrecht und dispensieren Sie **5 Tropfen** (150 µl) in die *Probenkavität* einer *Membrankassette*. Wenn Sie eine externe Qualitätskontrolle mittesten, so geben Sie **3 Tropfen** (150 µl) positive Kontrolle oder 150 µl *Verdünnungspuffer* mithilfe der Transferpipette in die Probenvertiefung der Kassette. (BITTE BEACHTEN: Als externe negative QK wird der *Verdünnungspuffer* verwendet)
4. Inkubieren Sie jede *Membrankassette* 10 Minuten lang bei Raumtemperatur.
5. Lesen Sie die Ergebnisse unmittelbar nach 10 Minuten ab: Prüfen Sie, ob im „C“ Kontrollbereich und/oder „T“ Testbereich des *Ergebnisfensters* jeder fertigen *Membrankassette* eine rote Linie sichtbar ist. Die Farbintensität der roten Linie kann schwach bis stark sein. (siehe Interpretation der Ergebnisse).

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Positives Ergebnis: Zwei rote Linien sind sichtbar: eine einzelne rote Linie im „T“ Testbereich des *Ergebnisfensters* und eine einzelne rote Linie im „C“ Kontrollbereich des *Ergebnisfensters*. Dies weist auf eine erhöhte Lactoferrinkonzentration und eine ordnungsgemäß reaktive Kontrolle hin.

Negatives Ergebnis: Es ist lediglich eine einzelne rote Linie im „C“ Kontrollbereich des *Ergebnisfensters* sichtbar. Im „T“ Testbereich des *Ergebnisfensters* sollte keine rote Linie sichtbar sein. Dies weist darauf hin, dass keine erhöhte Lactoferrinkonzentration im Stuhl und eine ordnungsgemäß reaktive Kontrolle vorhanden sind.

Ungültiges Ergebnis: Alle abgeschlossenen Reaktionen sollten eine sichtbare rote Linie im „C“ Kontrollbereich des *Ergebnisfensters* aufweisen. Der Test ist ungültig, wenn keine Kontrolllinie sichtbar ist oder nach abgeschlossener Reaktion keine Linie auf der *Membrankassette* erscheint.

QUALITÄTSKONTROLLE

Intern: Auf jeder *Membrankassette* muss nach dem Test eine rote Kontrolllinie auf der „C“-Seite des Ergebnisfenster sichtbar sein. Die rote Kontrolllinie bestätigt, dass Probe und Reagenzien korrekt zugegeben wurden, die Reagenzien während des Testverlaufs aktiv waren und eine korrekte Probenmigration durch die *Membrankassette* stattgefunden hat. Ein farbloser Hintergrund im Ergebnisbereich gilt als interne negative Kontrolle. Bei korrekt durchgeführtem Test und ordnungsgemäßer Funktion der Reagenzien ist der Hintergrund farblos, damit das Ergebnis erkennbar ist.

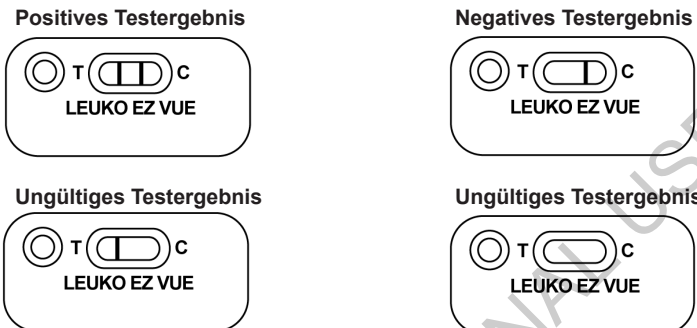
Extern: Die Reaktivität des *LEUKO EZ VUE®* Tests muss bei Erhalt anhand der *Positiven Kontrolle* und negativen Kontrolle (*Verdünnungspuffer*) überprüft werden. Die *Positive Kontrolle* ist im Kit enthalten (Flasche mit rotem Verschluss). Die *Positive Kontrolle* dient zur Überprüfung der Reaktivität der anderen Testreagenzien und ist nicht zur Bestätigung der Verlässlichkeit beim Cut-off bestimmt. Als negative Kontrolle wird der *Verdünnungspuffer* verwendet.

Es sollten weitere Tests einschließlich externer Kontrollen durchgeführt werden, um die Anforderungen lokaler, landes- und/oder bundesweiter Vorschriften und/oder von Zertifizierungsbehörden zu erfüllen.

Die mit den externen Kontrollen erwarteten Reaktionen sind im Abschnitt INTERPRETATION DER ERGEBNISSE beschrieben. Der Test darf nicht verwendet werden, wenn die Kontrolltests inkorrekte Ergebnisse liefern. Korrekte Ergebnisse mit der internen Kontrolllinie, der *positiven Kontrolle* sowie negativen Kontrolle (*Verdünnungspuffer*) zeigen an, dass der Test richtig durchgeführt wurde, die Antikörper auf der Membran und das *Konjugat*

während der Testzeit aktiv sind und die *Membrankassette* einen korrekten Probenfluss zulässt. Falsche Ergebnisse bei der internen und externen Kontrolle zeigen an, dass der Test nicht korrekt durchgeführt wurde (d. h. falsche Menge der zugegebenen Reagenzien, falsche Inkubationstemperatur- oder Zeit, Reagenzien wurden vor Testbeginn nicht auf Raumtemperatur gebracht). Wiederholen Sie die Kontrolltests als ersten Schritt zur Feststellung der Fehlerursache.

VISUELLE INTERPRETATION DER ERGEBNISSE



HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum des Kits ist auf der Packungsaußenseite angegeben. Das jeweilige Verfallsdatum für die einzelnen Bestandteile ist auf den einzelnen Etiketten angegeben. Das Kit mit den Reagenzien muss zwischen 2° und 30°C (im Kühlschrank oder bei Raumtemperatur) gelagert werden. Die *Membrankassetten* müssen bis zur Verwendung in den verschlossenen Beuteln verwahrt werden.

ERWARTUNGSWERTE

Die Prävalenz eines positiven Testergebnisses mit dem *LEUKO EZ VUE*® bei klinischen Untersuchungen lag zwischen 27% und 53%. Die Prävalenz ist von Ort zu Ort unterschiedlich. Krankenhäuser können auch niedrigere oder höhere Raten als jene an den Standorten zur Beurteilung des *LEUKO EZ VUE*® festgestellten aufweisen. Die Prävalenz ist je nach Häufigkeit von Ausbrüchen aufgrund verschiedener enteropathogener Erreger unterschiedlich.

LEISTUNGSDATEN

Beim Vergleich des *LEUKO EZ VUE*® mit dem *LEUKO-TEST* im Rahmen klinischer Studien wies der *LEUKO EZ VUE*® Test eine positive, negative und Gesamtübereinstimmung von 93%, 80% bzw. 83% auf. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Vergleich des *LEUKO EZ VUE*® mit dem *LEUKO-TEST*.

<i>LEUKO EZ VUE</i> ® im Vgl. zu <i>LEUKO-TEST</i> (N=375)	<i>LEUKO-TEST</i> Positiv	<i>LEUKO-TEST</i> Negativ	Gesamt
<i>LEUKO EZ VUE</i> ® Positiv	98	55	153
<i>LEUKO EZ VUE</i> ® Negativ	7	215	222
Gesamt	105	270	375

		95%-Konfidenz-Intervalle
Positive Übereinstimmung in %	93%	86% - 97%
Negative Übereinstimmung in %	80%	74% - 84%
Gesamtübereinstimmung in %	83%	80% - 86%

GRENZEN DES VERFAHRENS

- 1. Der *LEUKO EZ VUE*® Test weist erhöhte Lactoferrinkonzentrationen aus Leukozyten im Stuhl als Marker eine Darmentzündung nach. Der Test ist möglicherweise nicht für immungeschwächte Personen geeignet.
- 2. Die in der Gebrauchsanweisung empfohlene 1:50 Verdünnung für Stuhlproben wurde in klinischen Studien geprüft, und erwies sich als optimal für Stuhlverdünnungen. Die Verwendung niedrigerer Verdünnungen kann aufgrund des Vorhandenseins normaler Lactoferrinwerte zu positiven Reaktionen führen. Daher sollte nur die empfohlene Verdünnung verwendet werden.
- 3. Bis dato wurde der *LEUKO EZ VUE*® Test noch nicht klinisch für den Nachweis von Leukozyten in anderen klinischen Probenformen evaluiert.
- 4. Die Intensität der Testlinie einer positiven Probe ist kein Hinweis für die Lactoferrinmenge bzw. den Schweregrad der Erkrankung.
- 5. Stuhlproben von gestillten Säuglingen dürfen für diesen Test nicht verwendet werden.

KREUZREAKTIVITÄT

Verschiedene im Darm angesiedelte Organismen wurden mit dem *LEUKO EZ VUE*® Test auf Kreuzreaktivität untersucht. Für die Analyse wurden mit 1x-Verdünnungspuffer im Verhältnis 1:50 vermischte Bouillonkulturen evaluiert. Es wurden Bouillonkulturen in der Protokollphase mit $\geq 10^8$ Bakterien/ml verwendet. Es wurde keine Kreuzreaktivität mit den in Tabelle 2 aufgeführten mikrobiellen Organismen beobachtet.

Tabelle 2. Mikrobielle Organismen, die im *LEUKO EZ VUE*® Test getestet wurden.

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

Adenovirus type 1 (ATCC #VR-1)	Adenovirus type 2 (ATCC #VR-846)
Adenovirus type 3 (ATCC #VR-3)	Adenovirus type 5 (ATCC #VR-5)
Adenovirus type 40 (ATCC #VR-931)	Human coronavirus (ATCC #VR-740)
Enterovirus type 70 (VR-836)	Coxsackievirus B2 (VR-29)
Coxsackievirus B2 (VR-30)	Coxsackievirus B2 (VR-184)
Coxsackievirus B2 (VR-185)	Echovirus 18 (VR-48)
Echovirus 33 (VR-582)	Enterovirus type 70 (VR-784)

AUSWIRKUNGEN DER STUHLPROBENKONSISTENZ

Der *LEUKO EZ VUE*® Test weist Lactoferrin in flüssigen, halbfesten und festen Stuhlproben nach.

REPRODUZIERBARKEIT UND PRÄZISION

Die Inter-Assay-Variation wurde mittels Analyse von 7 Lactoferrin-negativen und 13 Lactoferrin-positiven Stuhlproben in einem Zeitraum von 3 Tagen bestimmt. Es ergab sich eine Korrelation von 100% für die positiven Proben und negativen Proben, einschließlich Proben nahe des Cut-off des Kits. Die Intra-Assay-Variation wurde mittels Analyse von 19 Stuhlproben unter Verwendung von 6 Replikaten in einer Kitcharge bestimmt. Es ergab sich eine Korrelation von 100% zwischen den Ergebnissen der Intra-Assay-Analyse.

INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Folgende Substanzen wirkten sich, wenn in den angegebenen Konzentrationen im Stuhl vorhanden, nicht auf die Testergebnisse aus: Mucin (5% w/v), lipämisches Serum (Stuhlfette, 5% v/v), Mylanta® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Bilirubin (5% w/v), Hämoglobin (10 mg/g Stuhl).

UTILISATION PRÉVUE

Le test **LEUKO EZ VUE®** est un dosage immunochromatographique de dépistage qualitatif des concentrations accrues de lactoferrine fécale, marqueur de leucocytes fécaux et indicateur d'inflammation intestinale. Le test **LEUKO EZ VUE®** détecte la lactoferrine dans les échantillons de selles liquides, semi-solides et solides. Un résultat de test positif indique un taux accru de lactoferrine fécale et nécessite des examens complémentaires.

EXPLICATION

Les diarrhées représentent l'une des causes principales de morbidité dans le monde. Seule la maladie des voies respiratoires supérieures aiguë devance le syndrome diarrhéique aigu par sa fréquence. La population des pays développés souffre en moyenne d'une à trois maladies par an provoquées par des pathogènes gastro-intestinaux, alors que dans les pays plus pauvres, la moyenne s'élève de 5 à 18 maladies par personne. Ces derniers cas sont particulièrement préoccupants puisqu'ils entraînent des taux de morbidité et de mortalité importants. On estime que plus de 12 000 enfants meurent chaque jour en Asie, Afrique et Amérique Latine de syndromes diarrhéiques (1,2). Les syndromes diarrhéiques sont causés par différents pathogènes, qu'il s'agisse de virus (rotavirus, norovirus, entérovirus et adénovirus), bactéries (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* entérotoxigènes et *Clostridium difficile* toxigène) ou de parasites (*Cryptosporidium* et *Entamoeba*). La plupart de ces pathogènes n'ont été reconnus que ces 20 dernières années et le diagnostic est à la fois difficile et coûteux.

Les syndromes diarrhéiques peuvent être divisés entre les diarrhées inflammatoires et les diarrhées non inflammatoires. Les diarrhées non inflammatoires incluent celles provoquées par les virus et la majorité des parasites et sont, pour la plupart, efficacement traitées avec une réhydratation par voie orale. Les diarrhées inflammatoires, en revanche, ont tendance à être plus graves et doivent être suivies par des examens plus poussés. Ce type de diarrhée est causé par les pathogènes tels que *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* et *Clostridium difficile* (3,4). Dans les diarrhées inflammatoires, les leucocytes fécaux sont présents en grande quantité dans les selles. La détermination des leucocytes fécaux par microscopie est une procédure utilisée par de nombreux laboratoires d'analyse pour identifier les diarrhées inflammatoires. Cette méthode présente toutefois des inconvénients. La microscopie n'est pas standardisée et les échantillons doivent être examinés dans les minutes suivant leur prélèvement pour obtenir des résultats précis (5). Le test peut s'avérer difficile à interpréter et la conservation des échantillons une nuit avant leur examen peut entraîner une baisse de sensibilité due à la lyse de cellules. Certains pathogènes intestinaux, comme *Clostridium difficile*, produisent des toxines qui détruisent les leucocytes et les autres cellules (6). En conséquence, les leucocytes peuvent ne pas être visibles à un stade tardif de l'infection, même si l'inflammation est sévère. La méthode de prélèvement affecte également la sensibilité du test. Les échantillons en coupe sont souvent difficiles à prélever mais ils sont plus sensibles pour les leucocytes que les frottis, qui ont tendance à détruire la morphologie des leucocytes (7).

Le test **LEUKO EZ VUE®** contourne les problèmes de microscopie en utilisant la technologie d'immunochromatographie et fournit des résultats en 10 minutes. Le dosage détecte les taux élevés de lactoferrine dans les échantillons de selles. La lactoferrine est très stable et n'est pas dégradée pendant les infections par les toxines des pathogènes comme *C. difficile* (6).

PRINCIPE DU TEST

Le test **LEUKO EZ VUE®** utilise les anticorps de lapin anti-lactoferrine conjugués directement à des particules d'or. La *Cassette-membrane* contient deux bandes d'anticorps immobilisés. Une bande contient des anticorps anti-lactoferrine. L'autre bandelette, qui correspond à une ligne de contrôle, comporte des anticorps anti-IgG. L'échantillon dilué et le conjugué d'or migrent par capillarité lorsque l'échantillon est ajouté dans le puits. Si un taux élevé de lactoferrine est présent dans l'échantillon, les complexes lactoferrine-

conjugué d'or se forment et sont capturés par les anticorps anti-lactoferrine immobilisés dans la bande. Les complexes lactoferrine-conjugué-anticorps apparaissent comme une ligne rouge simple dans la partie test de la *Fenêtre résultats*. Dans la bande de contrôle, le conjugué se lie avec les anticorps anti-IgG immobilisés, ce qui montre la migration correcte de l'échantillon et du conjugué le long de la membrane. Les complexes conjugué-anticorps anti-IgG apparaissent comme une ligne rouge simple dans la partie de contrôle de la *Fenêtre résultats*.

REACTIFS

DIL SPE **Diluant**, 65 ml (prêt à l'emploi, contient une solution saline tamponnée au phosphate, un détergent et du ProClin® 300 0,05 %)

Mot indicateur : Avertissement

H317 : Risque de réactions cutanées allergiques

P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

MEM CAS **Cassettes-membranes**, 25 (1 *Cassette-membrane* par sachet ; chaque membrane est enduite d'anticorps anti-lactoferrine et contient des anticorps marqués à l'or colloïdal)

CONTROL + **Contrôle Positif**, 3,5 ml (solution saline tamponnée au phosphate contenant de la lactoferrine humaine purifiée)

Pipettes de transfert jetables, 25 (élément évasé = 50 µl)

Dispositifs jetables de préparation des échantillons, 25 (25 tubes et 25 embouts de filtration)



PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Exclusivement réservé à une utilisation diagnostique *in vitro*.
2. Les réactifs du kit doivent être à température ambiante avant utilisation.
3. Le sachet contenant la *Cassette-membrane* doit être ouvert juste avant emploi.
4. Maintenir les *Cassettes-membranes* au sec avant de les utiliser.
5. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés. Ne pas utiliser le kit si la date d'expiration est dépassée.
6. Utiliser la dilution des échantillons fécaux selon les recommandations du kit. 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.
7. Ne pas congeler les réactifs. Le kit doit être conservé à une température comprise entre 2° et 30°C.
8. Toutes les *Cassettes-membranes* doivent être rapidement lues à 10 minutes.
9. Pour minimiser les effets de l'électricité statique, placer toutes les *Cassettes-membranes* avec la *Fenêtre résultats* vers le haut sur des serviettes en papier humides.
10. Les échantillons conservés dans un milieu de transport ou 10 % de formol, de formol thimérosal, de formol d'acétate de sodium, d'alcool polyvinyle ou d'autres fixateurs ne peuvent pas être utilisés.
11. 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. **Tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés comme des 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.
12. Après leur utilisation, les échantillons et les *Cassettes-membranes* doivent être manipulés et jetés de la même façon que des matières présentant un danger biologique.
13. S'équiper de gants jetables pendant le test.
14. Le *Diluant* contient du ProClin® 300 0,05 % comme conservateur. Même si la concentration est faible, ProClin® 300 est connu pour sa nocivité. En cas d'irritation de la peau ou d'éruption cutanée, consulter un médecin. Les vêtements contaminés doivent être ôtés puis lavés avant d'être réutilisés. Manipuler les réactifs selon les

réglementations existantes relatives à la sécurité des laboratoires et les bonnes pratiques de laboratoire. Les fiches de sécurité de ce produit sont disponibles à la demande. Contacter le support technique.

15. Respecter les arrêtés locaux, régionaux et nationaux relatifs aux réglementations sur l'élimination des déchets.

PREPARATIONS PRELIMINAIRES

1. Tous les réactifs doivent être retirés de la boîte et laissés à température ambiante avant d'être utilisés dans un essai.
2. **Préparation de la *Cassette-membrane*.** Chaque sachet contient 1 *Cassette-membrane* enduite d'anticorps polyclonaux spécifiques de la lactoferrine. Chaque échantillon ou contrôle nécessite une de ces *Cassettes-membranes*. Éviter le contact avec la membrane située dans la *Fenêtre résultats*.

PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

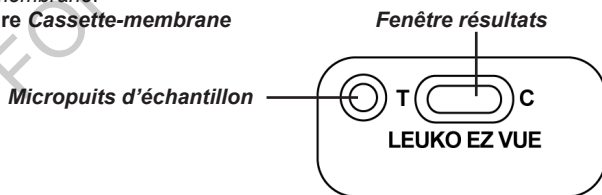
REMARQUE : recueillir les échantillons de selles dans un récipient propre et hermétique, sans agent de conservation. Les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8°C ou à température ambiante jusqu'à 2 semaines après le prélèvement puis congelés à -20°C ou plus bas. Les échantillons dilués doivent être conservés entre 2 et 8°C ou à température ambiante 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.** Les échantillons conservés dans un milieu de transport ou 10 % de formol, de formol thimérosal, de formol d'acétate de sodium, d'alcool polyvinyle ou d'autres fixateurs ne peuvent pas être utilisés.

1. **Préparer un échantillon dilué.**

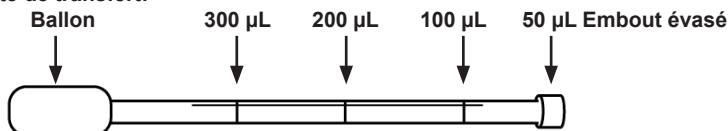
Échantillons fécaux : Préparer un tube plastique pour chaque échantillon à tester. Pour chaque échantillon, ajouter 2,5 ml de *Diluant* à chaque tube de dilution. Utiliser une pipette de transfert pour ajouter 50 µl (élément évasé) d'échantillon fécal liquide. Pour les échantillons de selles formés ou solides, 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*. Puis placer un embout de filtration en haut du tube contenant l'échantillon dilué et insérer fermement l'embout. On obtient ainsi une dilution de l'échantillon au 1/50.

2. Agiter les tubes pendant 10 secondes et les conserver à une température comprise entre 2° et 8°C jusqu'à réalisation du test. Agiter à nouveau avant de transférer 5 gouttes de l'échantillon dilué dans le *Micropuits d'échantillon* indiqué dans la figure *Cassette-membrane*.

Figure *Cassette-membrane*



Pipette de transfert:



PROCÉDURE

1. Récupérer la *Cassette-membrane*. Prélever le nombre nécessaire de *Cassettes-membranes*, un par échantillon, dans les sachets aluminisés.

2. Placer les *Cassettes-membranes* sur des serviettes en papier humides, avec la *Fenêtre résultats* dirigée vers le haut, et les étiqueter en conséquence.
3. Tout en maintenant chaque tube d'échantillon dilué vertical, ajouter **5 gouttes** (150 µl) dans le *Puits à échantillon* d'une *Cassette-membrane*. En cas de contrôle de qualité externe, ajoutez **3 gouttes** (150 µl) du contrôle positif ou 150 µl de *Diluant* en utilisant la pipette de transfert dans le *Puits à échantillon* de la cassette. (REMARQUE : le *Diluant* est utilisé comme contrôle externe négatif).
4. Incuber chaque *Cassette-membrane* pendant 10 minutes à la température ambiante.
5. Lire rapidement les résultats à 10 minutes : observer la *Fenêtre résultats* de chaque *Cassette-membrane* terminée pour détecter l'apparition d'une ligne rouge dans la partie contrôle « C » et/ou la partie test « T » de la fenêtre. La ligne rouge peut être de claire à foncée. (Voir la section Interprétation des résultats).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Résultat positif : Deux lignes rouges sont visibles, l'une dans la partie de test « T » de la *Fenêtre résultats* et l'autre dans la partie de contrôle « C » de la *Fenêtre résultats*, ce qui indique la présence de taux accrus de lactoferrine fécale et un contrôle correctement réactif.

Résultat négatif : Une seule ligne rouge est visible uniquement du côté contrôle « C » de la *Fenêtre résultats*. Aucune ligne ne doit apparaître dans la partie de test « T » de la *Fenêtre résultats*, ce qui indique l'absence d'élévation du taux de lactoferrine fécale et un contrôle correctement réactif.

Résultat nul : Toutes les épreuves réalisées doivent présenter une ligne rouge visible dans la partie de contrôle « C » de la *Fenêtre résultats*. Le test n'est pas valable si la ligne de contrôle est absente ou qu'aucune ligne n'apparaît sur la *Cassette-membrane* terminée.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Interne : Une ligne de contrôle rouge doit être visible dans la partie « C » de la *Fenêtre résultats* de chaque *Cassette-membrane* testée. L'apparition de la ligne de contrôle rouge confirme que l'échantillon et les réactifs ont été correctement ajoutés, que les réactifs étaient actifs au moment de la réalisation de l'essai et que l'échantillon a bien migré dans le dispositif à membrane. Un fond clair dans la zone résultat est considéré comme un contrôle interne négatif. Si le test a été réalisé correctement et que les réactifs fonctionnent bien, le fond sera clair afin de fournir un résultat discernable.

Externe : La réactivité du test *LEUKO EZ VUE®* doit être vérifiée à réception en utilisant le *Contrôle Positif* et le contrôle négatif (*Diluant*). Le *Contrôle Positif* est fourni avec le kit (flacon à capsule rouge). Le *Contrôle Positif* permet de confirmer la réactivité des autres réactifs associés à l'essai mais il ne permet pas de garantir la précision à la limite de détection de l'essai analytique. Le *Diluant* est utilisé pour le contrôle négatif.

Des tests supplémentaires avec contrôles externes doivent être réalisés pour répondre aux exigences des réglementations locales, nationales et/ou fédérales et/ou des organismes d'accréditation.

Les réactions attendues avec les contrôles externes sont décrites dans la section INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. Le test ne doit pas être utilisé si les tests de contrôle ne donnent pas les bons résultats. De bons résultats obtenus avec la ligne de contrôle interne, le *Contrôle positif* et le contrôle négatif (*Diluant*) indiquent que le test a été correctement réalisé, que les anticorps étalés sur la membrane et le *Conjugué* sont réactifs au moment du test et que la cassette permet un écoulement correct de l'échantillon. Une erreur sur les contrôles internes et externes empêchant l'obtention des résultats attendus, indique que le test n'a pas été correctement réalisé (volume de réactifs ajoutés incorrect, température d'incubation erronée, temps requis non respectés ou température des réactifs différente de la température ambiante au moment du test). Recommencer les tests de contrôle, car ceci est la première chose à faire pour déterminer l'origine de l'échec.

INTERPRÉTATION VISUELLE DES RÉSULTATS

Résultat de test positif



Résultat de test négatif



Résultat de test non valable



Résultat de test non valable



DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'expiration du kit est indiquée sur l'extérieur de l'emballage. La date d'expiration de chaque composant est indiquée sur chaque étiquette. Le kit contenant les réactifs doit être stocké entre 2° et 30°C (au réfrigérateur ou à température ambiante). Les Cassettes-membranes doivent être conservées dans les sachets fermés avant leur utilisation.

VALEURS ATTENDUES

La prévalence d'un résultat de test positif avec le test *LEUKO EZ VUE*® dans les investigations cliniques était comprise entre 27 % et 53 %. La prévalence peut varier d'un site à un autre, les hôpitaux pouvant constater des taux inférieurs ou supérieurs à ceux observés aux endroits où l'évaluation du test *LEUKO EZ VUE*® a été réalisée. La prévalence peut varier en fonction de l'incidence d'épidémies de divers pathogènes intestinaux.

EFFICACITÉ DU TEST

Lors de la comparaison du test *LEUKO EZ VUE*® au test *LEUKO-TEST* dans les études cliniques, le test *LEUKO EZ VUE*® présentait des concordances positives, négatives et globales respectivement de 93 %, 80 % et 83 %. Les résultats détaillés sont présentés au Tableau 1.

Tableau 1. Comparaison du test *LEUKO EZ VUE*® avec le test *LEUKO-TEST*.

<i>LEUKO EZ VUE</i> ® contre <i>LEUKO-TEST</i> (N=375)	<i>LEUKO-TEST</i> Positif	<i>LEUKO-TEST</i> Négatif	Total
<i>LEUKO EZ VUE</i> ® Positif	98	55	153
<i>LEUKO EZ VUE</i> ® Négatif	7	215	222
Total	105	270	375

Intervalles de confiance de 95%		
Pourcentage d'Accord Positif	93%	86% - 97%
Pourcentage d'Accord Négatif	80%	74% - 84%
Pourcentage d'Accord Global	83%	80% - 86%

LIMITES DE LA PROCÉDURE

1. Le test *LEUKO EZ VUE*® détecte les taux élevés de lactoferrine libérée par les leucocytes fécaux comme marqueur de l'inflammation intestinale. Le test peut ne pas être approprié aux personnes immunodéficientes.

- La dilution d'échantillons de selles au 1/50 recommandée par la brochure a été évaluée lors d'essais cliniques et s'est montrée optimale pour les dilutions fécales. L'utilisation de dilutions plus faibles peut entraîner des faux positifs en raison de la présence de taux normaux de lactoferrine. Ainsi, seule la dilution recommandée dans la brochure doit être appliquée.
- À ce jour, le test *LEUKO EZ VUE*® n'a pas été évalué cliniquement pour la détection des leucocytes dans d'autres types d'échantillons cliniques.
- L'intensité d'une ligne de test d'échantillon positif n'indique pas la quantité de lactoferrine ou la gravité de la maladie.
- Les échantillons de selles des nourrissons allaités ne doivent pas être utilisés avec ce test.

RÉACTIVITÉ CROISÉE

Différents organismes retrouvés dans les intestins ont été examinés afin de déceler une réactivité croisée dans le test *LEUKO EZ VUE*®. L'analyse a porté sur des cultures en milieu liquide mélangées avec le *Diluant* 1X au 1/50. Les cultures sur milieu liquide utilisées en phase logarithmique contenaient $\geq 10^8$ bactéries par ml. Aucune réactivité croisée n'a été observée avec l'un des organismes microbiens cités dans le Tableau 2.

Tableau 2. Organismes microbiens testés avec le test *LEUKO EZ VUE*®.

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

Adenovirus type 1 (ATCC #VR-1)	Adenovirus type 2 (ATCC #VR-846)
Adenovirus type 3 (ATCC #VR-3)	Adenovirus type 5 (ATCC #VR-5)
Adenovirus type 40 (ATCC #VR-931)	Human coronavirus (ATCC #VR-740)
Enterovirus type 70 (VR-836)	Coxsackievirus B2 (VR-29)
Coxsackievirus B2 (VR-30)	Coxsackievirus B2 (VR-184)
Coxsackievirus B2 (VR-185)	Echovirus 18 (VR-48)
Echovirus 33 (VR-582)	Enterovirus type 70 (VR-784)

EFFET DE LA CONSISTANCE DE L'ÉCHANTILLON DE SELLES

Le test *LEUKO EZ VUE*® détecte la lactoferrine dans les échantillons de selles liquides, semi-solides et solides.

REPRODUCTIBILITÉ ET PRÉCISION

La variation inter-essais a été déterminée par l'analyse de 7 échantillons de selles négatifs pour la lactoferrine et 13 échantillons positifs sur une période de 3 jours. Il existait une corrélation de 100 % pour les échantillons positifs et négatifs, notamment les échantillons proches de la limite de détection du kit. La variation intra-essai était déterminée par l'analyse de 19 échantillons de selles, chaque échantillon étant testé 6 fois avec un même lot de kits. Une corrélation de 100 % a été trouvée entre les résultats pour l'analyse intra-essai.

INTERFÉRENCES ANALYTIQUES

Les substances suivantes n'ont pas modifié le résultat des tests lorsqu'elles étaient présentes dans les selles aux concentrations indiquées ci-après : mucine (5 % p/v), sérum avec lipides (graisses fécales, 5 % v/v), Mylanta® (5 % v/v), Pepto-Bismol® (5 % v/v), Imodium® (5 % v/v), Kaopectate® (5 % v/v), bilirubine (5 % p/v), hémoglobine (10 mg/g selles).

REFERENCES

- Guerrant, R. L., J. M. Hughes, N. L. Lima, and J. Crane. 1990. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Rev. Infect. Dis.* 12:S41-S50.
- Guerrant, R. L., D. S. Shields, S. M. Thorson, J. B. Schorling, and D. H. M. Groschel. 1985. Evaluation and diagnosis of acute infectious diarrhea. *Am. J. Med.* 78:91-98.
- Harris, J. C., H. L. DuPont, and B. R. Hornick. 1971. Fecal leukocytes in diarrheal illness. *Ann. Intern. Med.* 76:697-703.
- Koplan, J. P., H. V. Fineberg, M. J. B. Ferraro, and M. L. Rosenberg. 1990. Value of stool cultures. *Lancet* 2:13-16.
- Tarr, P. 1991. Microbiology studies. In T. Yamada, D. H. Alpers, C. Owyang, D. W. Powell, and F. E. Silverstein (ed.), *Textbook of Gastroenterology*, pp. 2523-2538. J. B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Guerrant, R. L., V. Araujo, E. Soares, K. Kotloff, A. A. M. Lima, W. H. Cooper, and A. G. Lee. 1992. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. *J. Clin. Microbiol.* 30:1238-1242.
- Korzeniowski, O. M., F. A. Barada, J. D. Rouse, and R. L. Guerrant. 1979. Value of examination for fecal leukocytes in the early diagnosis of Shigellosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28:1031-1035.
- Okhuysen, P., E. Scerpella, J. Mathewson, C. Ericsson, R. Guerrant, E. Latimer, and D. Lyerly. 1992. Utility of a rapid latex agglutination test for lactoferrin for predicting infection due to invasive enteropathogens. *Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*
- 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*, pp. 44-48. American Society for Microbiology.
- Fan, K., A. J. Morris, and L. B. Reller. 1993. Application of rejection criteria for stool cultures for bacterial enteric pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 31:2233-2235.

Technical Support

Advice Line

Further information can be obtained from your distributor, or by contacting Alere Technical Support on:

US	+ 1 877 866 9335	TS.SCR@alere.com
Africa, Russia, CIS	+972 8 9429 683	ARCISproductsupport@alere.com
Asia Pacific	+61 7 3363 7711	APproductsupport@alere.com
Canada	+1 800 818 8335	CANproductsupport@alere.com
Europe & Middle East	+44 161 483 9032	EMEproductsupport@alere.com
Latin America	+57 26618797	LAPproductsupport@alere.com

The Alere Logo and Alere are trademarks of the Alere group of companies.

LEUKO EZ VUE, the TECHLAB Logo, and TECHLAB are trademarks of TECHLAB, Inc., under license.

ProClin is a trademark of Rohm and Hass Company.

© 2016 TECHLAB, Inc. All rights reserved.

RMS#: 91-355-01

Issued: 07/2016