

LACTOFERRIN SCAN®

An ELISA for the quantitative measurement of fecal lactoferrin
Catalog No. T5009 (96 Tests)

IVD *In Vitro* Diagnostic Medical Device

ESPAÑOL p. 10

Un ensayo ELISA para la medición cuantitativa de la lactoferrina fecal
N° de catálogo T5009 (96 Pruebas)

IVD Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*

DEUTSCH p. 19

Ein ELISA für die quantitative Messung von Lactoferrin im Stuhl
Katalognummer T5009 (96 Tests)

IVD *In-Vitro*-Diagnostikum

FRANCAISE p. 28

Dosage immunoenzymatique (ELISA) pour la mesure
quantitative de la lactoferrine fécale
Numéro de Catalogue T5009 (96 Analyses)

IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

Made in the USA

U. S. Patent # 7,192,724

Developed and Manufactured by:



TECHLAB®

2001 Kraft Drive
Blacksburg, VA 24060-6358 USA
www.techlab.com



EC REP Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

LACTOFERRIN SCAN®

INTENDED USE

The LACTOFERRIN SCAN® test is a quantitative ELISA for measuring concentrations of fecal lactoferrin, a marker for fecal leukocytes. An elevated level is an indicator of intestinal inflammation. The test can be used as an *in vitro* diagnostic aid to distinguish patients with active inflammatory bowel disease (IBD) from those with noninflammatory irritable bowel syndrome (IBS).

Caution: U.S. Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a physician.

EXPLANATION

Inflammatory bowel disease (IBD) affects an estimated 1 to 2 million people in the United States (1). Ulcerative colitis and Crohn's disease are the primary subgroups of IBD and both involve chronic inflammation of a noninfectious etiology. In cases of chronic intestinal illnesses, infectious diarrhea that may involve intestinal inflammation must be ruled out to confirm a diagnosis of IBD (e.g., those caused by *Shigella*, *Campylobacter*, and *Clostridium difficile*) (9). Although ulcerative colitis and Crohn's disease differ including disease location and complications, both involve disease states that oscillate between flare and remission. During active disease, leukocytes infiltrate the intestinal mucosa and increase the level of fecal lactoferrin (2-10). IBD patients with active disease may present with symptoms similar to another chronic illness, irritable bowel syndrome (IBS), a noninflammatory condition that may affect as many as 20 million Americans, making it difficult to diagnose in the early stages of disease (1). In persons with IBS, the intestine appears normal upon endoscopic examination, leukocytes are not present in the mucosa, and fecal lactoferrin levels are at baseline (6). In suspected cases of ulcerative colitis and Crohn's disease, colonoscopy and barium x-ray examinations are the most commonly used techniques for confirmation of intestinal inflammation and ulceration (2). A non-invasive quantitative test such as the LACTOFERRIN SCAN® test demonstrates active intestinal inflammation and provides physicians an aid for distinguishing IBS from IBD.

PRINCIPLE OF THE TEST

The LACTOFERRIN SCAN® 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, standards and serial dilutions of fecal specimens are transferred to the microassay wells. If detectable levels of lactoferrin are present in the specimen, the lactoferrin will bind to the immobilized antibody. After incubation, the wells are washed and the antibody conjugate is added. The conjugate will bind to the lactoferrin bound during the first incubation phase. Any unbound material is removed during a second series of wash steps. Following the addition of *Substrate*, a color is detected due to the enzyme-antibody-antigen complexes that form in the presence of lactoferrin. The absorbance measured is directly proportional to the concentration of lactoferrin present. Lactoferrin standards ranging from 6.25 to 100 ng/mL are used to generate a standard curve. By plotting absorbance values versus lactoferrin concentrations, the lactoferrin concentration in a test sample can be determined.

MATERIALS PROVIDED

DIL 10X

10X Diluent, 40 mL (10X concentrate of a buffered protein solution containing 0.2% thimerosal). The 1X *Diluent* is also used as the negative control (see TEST PROCEDURE)*

Signal Word: Warning

H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure P260, P314, P501



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)
LS1 - 5	Standards , 1.5 mL each of LS1 (100 ng/mL), LS2 (50 ng/mL), LS3 (25 ng/mL), LS4 (12.5 ng/mL), and LS5 (6.25 ng/mL) - human lactoferrin standards in a buffered protein solution containing 0.02% thimerosal*
CONTROL +	Positive Control , 1.5 mL (10 µg/mL; human lactoferrin in protein buffered solution containing 0.02% thimerosal)*
WASHBUF 20X	Wash Buffer Concentrate , 50 mL (20X concentrate containing phosphate-buffered saline, detergent and 0.2% thimerosal)* Signal Word: Warning H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure P260, P314, P501
H₂SO₄ 0.6N	Stop Solution , 7 mL (0.6 N sulfuric acid). CAUTION: Avoid contact with skin. Flush with water immediately if contact occurs. Signal Word: Danger H314: Causes severe skin burns and eye damage P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501
MA PLT	Microassay Plate , 12 strips, 8 wells per strip, coated with purified polyclonal antibody specific for lactoferrin (stored with desiccant)

*contains mercury



PRECAUTIONS

1. Rx Only - Prescription Only
2. Reagents from different kits should not be mixed. Do not use the kit past the expiration date.
3. Reagents should be removed from the kit box and allowed to reach room temperature before use.
4. Caps and tips are color coded; do not mix!
5. Gently mix all reagents before dispensing.
6. When handling the microassay wells, avoid scratching the bottom of the wells because this may result in elevated absorbance readings.
7. Hold dropper bottles vertically to ensure proper drop size.
8. Handle specimens and used microassay wells as if capable of transmitting infectious agents. Wear gloves when doing the test.
9. Unused microassay wells must be placed inside the resealable foil pouch with the desiccant to protect them from moisture.
10. Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions.
11. Use fecal specimens within 2 weeks of collection for optimal results. Frozen specimens (-20°C or lower) may lose activity due to freezing and thawing multiple times.
12. Carefully measure fecal specimens to ensure a correct dilution. Difficult to measure specimens should be weighed.
13. Do not freeze the reagents. Store the kit between 2°C 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.
16. The *Positive Control* and *Standards* (LS1-5) contain lactoferrin which is a human derived material. Material has been tested and found negative for antibodies 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*.

4. 17. The *10X Diluent* and the *20X Wash Buffer Concentrate* contain 0.2% thimerosal as a preservative. Once diluted to normal use concentration these solutions are classified as non-hazardous. The *Stop Solution* contains 0.6 N sulfuric acid. Flush with water immediately if contact occurs. Take off contaminated clothing and wash it before re-use. 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.
18. Follow your national, regional, and local ordinances accordingly for waste disposal regulations. Do not place in trash, dispose of as hazardous waste.

PRELIMINARY PREPARATIONS

1. Remove all reagents from the kit box to warm to room temperature before use.
2. **Prepare 1X Wash Solution.** The *Wash Solution* is supplied as a 20X concentrate (a precipitate may be noticed). It should be mixed and diluted 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°C and 8°C.
3. **Prepare 1X Diluent.** The *Diluent* is supplied as a 10X concentrate (a precipitate may be noticed). It should be mixed and diluted 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°C 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 foil bag and carefully resealed with desiccant.

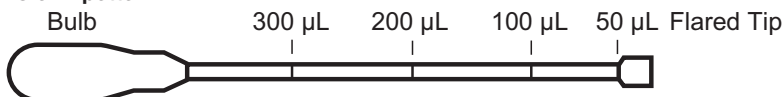
COLLECTION OF SPECIMENS AND PREPARATION OF DILUTIONS

NOTE: Collect fecal specimen into a clean, airtight container with no preservatives. Specimens should be stored between 2°C 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°C 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.

Prepare Diluted Specimen:

1. Set up three plastic tubes for each test specimen. *Label the tubes #1-#3.* For each specimen, add 450 µL of 1X *Diluent* to each of the three tubes using a pipette. Using a transfer pipette, measure 50 µL of feces (wipe excess specimen from the pipette tip) and add to tube #1. Discard the transfer pipette following the initial specimen dilution. **For Liquid/Soft Fecal Specimens** - Using a transfer pipette, carefully add 50 µL (first mark or top of flared tip) of the specimen to tube #1 (1:10 dilution of specimen) and mix well using a vortex mixer. Measure specimen carefully to ensure the correct dilution. **For Formed/Solid Fecal Specimens** - Weigh 0.05g or fill the flared tip of the transfer pipette (50 µL; see diagram below) and add to tube #1 (1:10 dilution of specimen) and mix well using a vortex mixer. Measure specimen carefully to ensure the correct dilution.

Transfer Pipette:



2. Transfer 50 µL from tube #1 into tube #2 using a new transfer pipette and vortex (1:100 dilution of specimen).
3. Transfer 50 µL from tube #2 into tube #3 using the same transfer pipette (1:1,000 dilution of specimen).

Prepare *Positive Control*:

4. Set up two plastic tubes for the *Positive Control*. Add 450 μL of 1X *Diluent* to tube #1 and 950 μL to tube #2 using a calibrated pipette.
5. Transfer 50 μL of *Positive Control* to tube #1 (1:10 dilution of *Positive Control*) and mix well using a vortex mixer. Transfer 50 μL from tube #1 to tube #2 using a calibrated pipette (1:200 dilution of *Positive Control*).
6. Vortex all tubes for 10 seconds and store between 2° and 8°C until the ELISA is performed. Vortex again before transferring diluted specimens and *Positive Control* to the microassay wells. This ensures thorough mixing of the specimen and controls.

TEST PROCEDURE

Materials provided

2 Plastic adhesive sheets

100 transfer pipettes

Materials and equipment required but not provided

Squirt bottle for 1X *Wash Solution*

Vortex mixer

Refrigerator for storage

Tubes for dilution of specimen

Discard container/absorbent paper

Bottle for 1X *Diluent*

Distilled or deionized water

Incubator set at 37°C $\pm$ 2°C

ELISA reader (450 nm or 450/620 nm)

1. Designate and use 2 wells for each Standard, 1 well for the negative control (1X *Diluent*), 1 well for the 1:200 dilution of *Positive Control* and 1 well for specimen dilutions 1:100 and 1:1000. See the table under QUALITY CONTROL for example of well locations.
2. Using a calibrated pipette, add 100 μL of each *Standard* LS1-LS5 to duplicate wells and 100 μL of the 1X *Diluent* and *Positive Control* to designated wells.
3. Add 100 μL from each specimen dilution (1:100 and 1:1000) to separate wells.
4. Cut the adhesive plastic sheet to the size necessary to cover the wells. Cover the wells and incubate them at 37°C $\pm$ 2°C for 30 minutes stationary.
5. Shake out the contents of the assay wells into a discard pan.
6. Wash each well 5 times using the 1X *Wash Solution* in a squirt bottle with a fine tipped nozzle, directing the *Wash Solution* to the bottom of the well with force (i.e. fill the wells, then shake the *Wash Solution* out of the wells into a discard pan). Slap the inverted plate on a dry paper towel and repeat **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.
7. Add 1 drop of *Conjugate* (red cap) to each well. Incubate the wells at 37°C $\pm$ 2°C for 30 minutes stationary.
8. Repeat step #6. *Dispose of paper towels and specimen containers properly.*
9. 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 this incubation period.
10. Add 1 drop of *Stop Solution* (yellow cap) to each well. Gently tap the wells to mix and wait 2 minutes before reading. The addition of the *Stop Solution* converts the blue color to a yellow color which may be quantitated by measuring the optical density at 450 nm or 450/620 nm on a microplate ELISA reader. Wipe the underside of each well with a soft paper towel before measuring the optical density. Read within two to ten minutes after adding *Stop Solution*.
11. Record absorbance values for the *Positive Control* dilution, for the negative control, for each specimen dilution, and for the standards.
12. Average the acceptable readings of duplicate wells before interpreting results.

QUALITY CONTROL

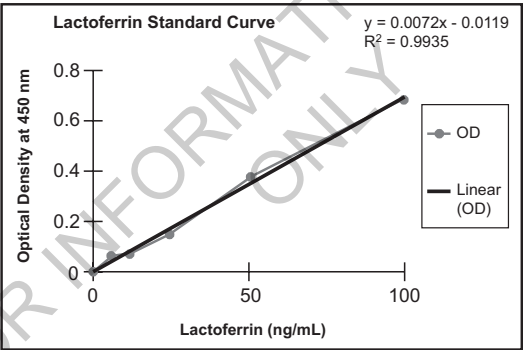
The negative control well containing 1X *Diluent* should have an OD₄₅₀ <0.100 or OD_{450/620} <0.060. The calculated concentration for the *Positive Control* should be in the range of 10 ± 3 µg/mL recovery. Typical layout and values for the standards and samples are shown in the following table and graph. Following the Linear Trend/Regression Type analysis, the R² value should be ≥ 0.98. If graph paper is used, points should appear in a straight line.

Typical Layout for Test Samples

LS1 - LS5 - Lactoferrn standards S1 - S18 - Specimens at 1/100 and 1/1000 dilutions

	1	2	3	4	5	6
A	NC	PC(200)	S3(100)	S3(1000)	S11(100)	S11(1000)
B	LS1	LS1	S4(100)	S4(1000)	S12(100)	S12(1000)
C	LS2	LS2	S5(100)	S5(1000)	S13(100)	S13(1000)
D	LS3	LS3	S6(100)	S6(1000)	S14(100)	S14(1000)
E	LS4	LS4	S7(100)	S7(1000)	S15(100)	S15(1000)
F	LS5	LS5	S8(100)	S8(1000)	S16(100)	S16(1000)
G	S1(100)	S1(1000)	S9(100)	S9(1000)	S17(100)	S17(1000)
H	S2(100)	S2(1000)	S10(100)	S10(1000)	S18(100)	S18(1000)

Typical Absorbance Values (OD₄₅₀) for the Lactoferrin Standard Curve



CALCULATION OF RESULTS

The results in this insert were determined using a Linear Trend/Regression Type analysis. Other data reduction methods may give slightly different results.

1. An appropriate data reduction computer program, using Linear Trend/Regression Type analysis, should be used for optimal estimation of sample values. If a computer program is not available, the data may be plotted using graph paper.
2. Choose the most diluted specimen that gives an OD₄₅₀ or OD_{450/620} value within the standard curve and OD ≥0.100 or 0.060, respectively. If both sample dilutions have absorbance readings greater than the highest concentration of standard, repeat using additional 1:10 dilutions. Conversely, any sample having an absorbance reading less than the lowest concentration of standard should be retested using the 1:10 dilution and if found negative recorded as <1 µg/g wet weight.
3. Plot the average absorbance values of the *Standards* on the y-axis versus the concentration on the x-axis.
4. Perform the Linear Trend/Regression Type analysis and determine if the R² value is ≥ 0.98.

5. Instruct the program to produce the equation for the plotted line. The equation should fit the equation of a line which is $Y = MX + B$, where $Y = OD_{450}$ or $OD_{450/620}$ of the sample, M = Slope, B = Y-intercept and X = Concentration of the unknown sample.
6. Solve the equation for X to determine the concentration of lactoferrin in the specimen.
7. Multiply the value of the unknown sample by the dilution factor.
8. Divide by 1000 to convert ng/mL to $\mu\text{g/mL}$ (approximately $\mu\text{g/g}$ wet weight).

Example Calculation

1. A graph was produced using the data provided in the Quality Control section of this Package Insert.
2. Linear analysis of the graph produced the following equation: $y = 0.0072x - 0.0119$ and an R^2 value of 0.99.
3. The 1:1000 dilution of specimen #2 was picked for analysis with an absorbance value of 0.450.
4. Solving for X yields: $X = 64 \text{ ng/mL}$.
5. Multiply by the dilution factor: $64 \times 1000 = 64,000 \text{ ng/mL}$.
6. Convert to $\mu\text{g/g}$ by dividing by 1000: $64,000 / 1000 = 64 \mu\text{g/g}$ wet weight.

INTERPRETATION OF VALUES

Lactoferrin Level in feces	Interpretation of results
0 to 7.24 $\mu\text{g/mL}$ (g) feces	Baseline (normal)
$\geq 7.25 \mu\text{g/mL}$ (g) feces	Elevated

SHELF-LIFE AND STORAGE

The expiration date is given on the outside label of the kit. 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

A multi-center clinical study (3 sites) was done evaluating fecal lactoferrin levels in 180 patients suffering with IBS and IBD (ulcerative colitis disease and Crohn's disease), and compared to 56 healthy persons. Patients were assessed for active disease using the Harvey Bradshaw Activity Index (HBAI) and fecal samples were collected for lactoferrin analysis. Patients with IBS had lactoferrin levels similar to healthy control persons ($p > 0.999$). Fecal lactoferrin levels were significantly greater in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis, compared to healthy controls ($p < 0.05$, $p < 0.0006$). A significant number of patients defined as inactive using HBAI had elevated fecal lactoferrin indicating intestinal inflammation. Fecal lactoferrin levels for the study population and statistical analysis of LACTOFERRIN SCAN® test results as compared to the HBAI are shown in Table 1 and Table 2, respectively.

Table 1. Fecal lactoferrin levels of the study population

Study Population N=235	No. of specimens	Fecal lactoferrin (mean µg/mL ± SE)
Inactive UC	41	65.65 ± 24.20
Active UC	31	1814.89 ± 788.25
Inactive CD	26	239.41 ± 82.73
Active CD	51	672.11 ± 241.79
IBS	31	1.27 ± 0.29
Healthy persons	55	1.55 ± 0.41

Table 2. LACTOFERRIN SCAN® test results for distinguishing active inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome/healthy persons

N = 178	Active IBD based on HBAI assessment ≥4	IBD (31)/Healthy Persons (55) based on clinical and self assessment
LACTOFERRIN SCAN® test Elevated	75	3
LACTOFERRIN SCAN® test Baseline	17	83

Sensitivity	81.5%
Specificity	96.5%
Predictive Positive Value	96.2%
Predictive Negative Value	83.0%
Correlation	88.8%

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The LACTOFERRIN SCAN® test is a quantitative test that measures the level of fecal lactoferrin released from leukocytes. The test may not be appropriate in immunocompromised persons. The following patient samples should be excluded from use in the LACTOFERRIN SCAN® 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. Fecal lactoferrin concentrations should not be interpreted as absolute evidence for the presence of a gastrointestinal illness. Prediction of active and inactive disease should be based on a complete clinical evaluation of the patient that may also include multiple fecal lactoferrin level determinations.
3. At this time, the LACTOFERRIN SCAN® test has not been clinically evaluated for use in the detection of leukocytes in other types of clinical specimens. It should be used 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. Other intestinal ailments, including many gastrointestinal infections and colorectal cancer, often result in elevated levels of lactoferrin in fecal specimens. Therefore, when

evaluating a patient, a clinical assessment must be considered along with LACTOFERRIN SCAN® test results.

6. High levels of fecal lactoferrin may be observed with clinical specimens. Specimens should be serially diluted until the absorbance value falls within the lactoferrin standard curve.
7. 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 LACTOFERRIN SCAN® test. For the analysis, broth cultures mixed with 1X *Diluent* were evaluated. Broth cultures at log phase containing $\geq 10^8$ bacteria per mL were used. Organisms that did not react in the LACTOFERRIN SCAN® test are listed as follows:

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

EFFECT OF FECAL SAMPLE CONSISTENCY

There were no differences observed between fecal specimens having liquid, semi-solid, or solid consistency when compared to the LACTOFERRIN CHEK® test results and/or clinical assessments for disease activity.

REPRODUCIBILITY AND PRECISION

The inter-assay variation was determined by quantitatively analyzing 9 fecal specimens over a 3 day period. The %CV ranged from 12.0% to 47.7%, with a mean value of 33.5% for positive specimens. The intra-assay variation was determined by quantitatively analyzing 9 fecal specimens using 4 replicates in one lot of kits. The %CV ranged from 7.9% to 16.0%, with a mean value of 12.0% for positive specimens.

LACTOFERRIN SCAN® - ESPAÑOL

USO INDICADO

El test LACTOFERRIN SCAN® es un ELISA cuantitativo para medir las concentraciones de lactoferrina fecal, un marcador de leucocitos fecales. Un nivel elevado es un indicador de la inflamación intestinal. Puede utilizarse como herramienta de ayuda diagnóstica in vitro para diferenciar a los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) activa de los que padecen el síndrome del colon irritable (SCI), que no es un proceso inflamatorio. Precaución: La Ley Federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo o bajo prescripción médica.

FUNDAMENTO

Se calcula que la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) afecta a entre 1 y 2 millones de personas en Estados Unidos (1). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son los principales subgrupos de la EII y en ambos procesos existe inflamación crónica de etiología no infecciosa. En los casos de enfermedades intestinales crónicas se debe descartar la diarrea infecciosa capaz de causar inflamación intestinal para confirmar el diagnóstico de EII (p. ej., las causadas por *Shigella*, *Campylobacter* y *Clostridium difficile*) (9). Aunque la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn difieren en localización y complicaciones, ambas son trastornos que oscilan entre la exacerbación y la remisión. Durante la enfermedad activa, los leucocitos se infiltran en la mucosa intestinal y aumentan el nivel de lactoferrina fecal (2-10). Los pacientes con EII activa pueden presentar síntomas similares a los de otra enfermedad crónica, el síndrome del colon irritable (SCI), un trastorno no inflamatorio que afecta a 20 millones de estadounidenses, que dificulta su diagnóstico durante las fases iniciales de la enfermedad (1). En personas con SCI, la exploración endoscópica revela un intestino de aspecto normal, sin leucocitos presentes en la mucosa y con niveles basales de lactoferrina fecal (6). Ante la sospecha de colitis ulcerosa o de enfermedad de Crohn, la colonoscopia y las exploraciones radiológicas baritadas son las técnicas más utilizadas para la confirmación de la ulceración y la inflamación intestinal (2). Una prueba cuantitativa no invasiva como el test LACTOFERRIN SCAN® demuestra la inflamación intestinal activa y ayuda a los médicos a distinguir el SCI de la EII.

PRINCIPIO DEL TEST

En el test LACTOFERRIN SCAN® 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 la prueba se transfieren patrones y diluciones seriadas de las muestras fecales a los pocillos de microanálisis. Si la muestra contiene niveles detectables de lactoferrina, esta se unirá al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación, los pocillos se lavan y se añade el conjugado de anticuerpos. El conjugado se unirá a la lactoferrina durante la primera fase de incubación. El material no unido se elimina durante la segunda serie de pasos de lavado. Tras la adición de un *Sustrato*, se detecta un color debido a los complejos enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en presencia de lactoferrina. La absorbancia medida es directamente proporcional a la concentración de lactoferrina presente. Se utilizan patrones de lactoferrina comprendidos entre 6,25 ng/ml y 100 ng/ml para generar la curva patrón. La concentración de lactoferrina presente en la muestra analizada se determina representando gráficamente los valores de la absorbancia frente a las concentraciones 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).*

Palabra de advertencia: Advertencia

H373: Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas

P260, P314, P501



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	Sustrato , 14 ml (solución que contiene tetrametilbenzidina y peróxido).
LS1	- 5	Patrones , 1,5 ml de LS1 (100 ng/ml), LS2 (50 ng/ml), LS3 (25 ng/ml), LS4 (12,5 ng/ml) y LS5 (6,25 ng/ml) – Patrones de lactoferrina humana en una solución tamponada de proteínas que contiene timerosal al 0,02%.*
CONTROL	+	Control Positivo , 1,5 ml (10 µg/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%).* Palabra de advertencia: Advertencia H373: Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas P260, P314, P501
H ₂ SO ₄	0.6N	Solución de Parada , 7 ml (ácido sulfúrico 0,6 N). ATENCIÓN: Evite el contacto con la piel. Aclarar inmediatamente con agua si se produce el contacto. Palabra de advertencia: Peligro H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501
MA	PLT	Placa para microanálisis , 12 tiras, 8 pocillos por cada tira, recubiertos con anticuerpos policlonales purificados específicos de lactoferrina (conservados con desecante).

*contiene mercurio



PRECAUCIONES

1. Rx Only - Solo con receta
2. No deben mezclarse los reactivos de kits diferentes. No utilizar los kits después de la fecha de caducidad.
3. Extraer los reactivos de la caja del kit y permitir que alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
4. Los tapones y las puntas están codificados por colores y no deben mezclarse.
5. Mezclar suavemente todos los reactivos antes de su uso.
6. Cuando se manipulen pocillos de microanálisis, evitar el raspado del fondo de los pocillos, ya que esto podría causar lecturas de absorbancia elevadas.
7. Sostenga los frascos del gotero verticalmente para garantizar un tamaño de gota adecuado.
8. Manipular las muestras y los pocillos de microanálisis utilizados como potenciales transmisores de agentes infecciosos. Utilizar guantes para realizar el test.
9. Los pocillos de microanálisis no utilizados deben colocarse en la bolsa resellable de papel de aluminio junto con el desecante para protegerlos de la humedad.
10. Efectuar el procedimiento de lavado tal como se indica para evitar reacciones de fondo elevadas.
11. Utilice las muestras fecales antes de dos semanas desde su obtención para que los resultados sean óptimos. Las muestras congeladas (-20° C o inferior) pueden perder actividad por múltiples ciclos de congelación y descongelación.
12. Mida cuidadosamente las muestras fecales para garantizar una dilución correcta. Las muestras difíciles de medir deben pesarse.
13. No congelar los reactivos. Conservar los kits entre 2 °C y 8 °C.
14. El **Sustrato** 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 alteracio-

- nes del procedimiento especificado y/o de las condiciones del test pueden afectar a su sensibilidad y especificidad.
16. El *Control Positivo* y los *Patrones* (LS1-5) contienen 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 el 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.
 17. El *diluyente* 10X y el *Concentrado de tampón de lavado* 20X contienen timerosal al 0,2% como conservante. Una vez diluidas hasta la concentración de uso normal, estas soluciones se clasifican como no peligrosas. La *Solución de Parada* contiene ácido sulfúrico 0,6 N. Aclarar inmediatamente con agua si se produce el contacto. 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.
 18. Siga las normas nacionales, regionales y locales para consultar los reglamentos de eliminación de residuos. No lo tire a la basura, elimínelo como residuo peligroso.

PREPARACIONES PRELIMINARES

1. Extraer todos los reactivos de la caja del kit para que alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
2. **Preparar la Solución de Lavado 1x.** La *Solución de Lavado* se suministra como concentrado 20x (puede apreciarse un precipitado). Se debe mezclar y diluir hasta un volumen total de 1 litro añadiendo 50 ml del concentrado y 950 ml de agua desionizada. Etiquetar el frasco. Conservar la *Solución de Lavado* 1x no utilizada a entre 2 °C y 8 °C.
3. **Preparar el Diluyente 1x.** El *Diluyente* se suministra como concentrado 10x (puede apreciarse un precipitado). Se debe mezclar y diluir hasta un volumen total de 400 ml añadiendo 40 ml del concentrado y 360 ml de agua desionizada. Etiquetar el frasco. Conservar el *Diluyente* 1x no utilizado a 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 papel de aluminio y resellarse con cuidado con desecante.

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

NOTA: Recoja la muestra fecal 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 su obtención, congelándolas posteriormente a una temperatura igual o inferior a -20 °C. Las muestras diluidas se deben conservar a una temperatura de 2 °C a 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.

Preparar la muestra diluida:

1. Asignar tres tubos de plástico para cada muestra a analizar. *Etiquetar los tubos del nº 1 al nº 3.* En cada muestra, añadir 450 µl de *Diluyente* 1x a cada uno de los tres tubos utilizando una pipeta. Utilizando una pipeta, medir 50 µl de heces (limpiar el exceso de muestra de la punta de la pipeta) y añadir al tubo nº 1. Desechar la pipeta

después de la dilución inicial de la muestra. **Para muestras fecales líquidas/blandas** – Utilizando una pipeta, añadir cuidadosamente 50 µl (primera marca o parte superior de la punta ancha) de la muestra al tubo nº 1 (dilución 1:10 de la muestra) y mezclar con un mezclador de tipo vórtex. Medir cuidadosamente la muestra para garantizar una dilución correcta. **Para muestras fecales formes/sólidas** – Pesar 0,05 g o llenar la punta ancha de la pipeta (50 µl; consulte el siguiente diagrama) y añadir al tubo nº 1 (dilución 1:10 de la muestra) y mezclar con un mezclador de tipo vórtex. Medir cuidadosamente la muestra para garantizar una dilución correcta.

Pipeta: Bulbo 300 µl 200 µl 100 µl 50 µl Punta ancha



- Transferir 50 µl del tubo nº 1 al tubo nº 2 utilizando una pipeta nueva y un vórtex (dilución 1:100 de la muestra).
- Transferir 50 µl del tubo nº 2 al tubo nº 3 utilizando la misma pipeta (dilución 1:1000 de la muestra).

Preparar el Control Positivo:

- Asignar dos tubos de plástico para el *Control Positivo*. Añadir 450 µl del *Diluyente* 1x al tubo nº 1 y 950 µl al tubo nº 2 utilizando una pipeta calibrada.
- Transferir 50 µl del *Control Positivo* al tubo nº 1 (dilución 1:10 del *Control Positivo*) y mezclar con un mezclador de tipo vórtex. Transferir 50 µl del tubo nº 1 al tubo nº 2 utilizando una pipeta calibrada (dilución 1:200 del *Control Positivo*).
- Mezclar con un vórtex todos los tubos durante 10 segundos y almacenarlos a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C hasta que realice el ELISA. Mezclar de nuevo con un vórtex antes de transferir las muestras diluidas y el *Control Positivo* a los pocillos de microanálisis. De esta forma se garantiza que la muestra y los controles se mezclan bien.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

Materiales suministrados

Dos hojas adhesivas de plástico 100 pipetas

Materiales y equipamiento necesarios no suministrados

Frasco con rociador para la <i>Solución de Lavado</i> 1x	Mezclador de tipo vórtex
Nevera para conservación	Tubos para la dilución de las muestras
Contenedor desechable/papel absorbente	Frasco para el <i>Diluyente</i> 1x
Agua destilada o desionizada	Incubadora a 37 °C ± 2 °C
Lector de ELISA (450 nm o 450/620 nm)	

- Designar y utilizar 2 pocillos para cada *Patrón*, 1 pocillo para el control negativo (*Diluyente* 1x), 1 pocillo para la dilución 1:200 del *Control Positivo* y 1 pocillo para las diluciones 1:100 y 1:1000 de la muestra. Consulte la tabla del apartado CONTROL DE CALIDAD para ver un ejemplo de la localización de los pocillos.
- Utilizando una pipeta calibrada, añadir 100 µl de cada *Patrón* (LS1 a LS5) para duplicar los pocillos y 100 µl del *Diluyente* 1x y del *Control Positivo* a los pocillos designados.
- Añadir 100 µl de cada dilución de la muestra (1:100 y 1:1000) a otros pocillos.
- Recortar la hoja adhesiva de plástico al tamaño necesario para cubrir los pocillos. Cubrir los pocillos e incubarlos a 37 °C ± 2 °C durante 30 minutos sin movimiento.
- Vaciar el contenido de los pocillos de análisis a un contenedor de desechos.
- Lavar cada pocillo 5 veces con la *Solución de Lavado* 1x utilizando un frasco rociador

con boquilla de punta fina, dirigiendo con fuerza la *Solución de Lavado* al fondo del pocillo (es decir, llenar los pocillos y a continuación transferir la *Solución de Lavado* de los pocillos a un contenedor de residuos). Golpear la placa invertida sobre una compresa de papel seca y repetir **cuatro veces** utilizando una compresa de papel seca cada vez. Si se observan partículas en los pocillos, seguir lavando hasta que se elimine esta materia.

- 7. Añadir 1 gota de *Conjugado* (tapón rojo) a cada pocillo. Incubar los pocillos a 37° C ± 2° C durante 30 minutos sin movimiento.
- 8. Repetir el paso nº 6. *Eliminar adecuadamente las compresas de papel y los contenedores de muestras.*
- 9. Añadir dos gotas de *Sustrato* (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 este periodo de incubación.
- 10. Añadir una gota de *Solución de Parada* (tapón amarillo) a cada pocillo. Golpear suavemente los pocillos para mezclarlos y esperar 2 minutos antes de efectuar 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 o 450/620 nm en un lector de microplacas de ELISA. Antes de determinar la densidad óptica, limpiar la parte inferior de cada pocillo con una compresa de papel para retirar la humedad. Leer entre 2 y 10 minutos tras añadir la *Solución de Parada*.
- 11. Registrar los valores de absorbancia de la dilución del control positivo, del control negativo, de cada dilución de la muestra y de los patrones.
- 12. Calcular el valor promedio de las lecturas aceptables de los pocillos duplicados antes de interpretar los resultados.

CONTROL DE CALIDAD

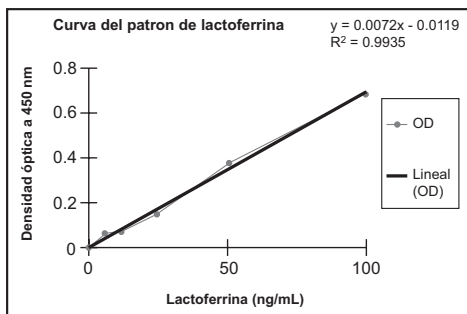
El pocillo del control negativo que contiene el *Diluyente* 1x debe tener una OD₄₅₀ <0,100 o una OD_{450/620} <0,060. La concentración calculada del *Control Positivo* debe encontrarse en el rango de recuperación de 10 ± 3 µg/ml. En la tabla y en el gráfico siguiente se muestran los valores y la distribución típica de los patrones y de las muestras. De acuerdo con el análisis del tipo de tendencia/regresión lineal, el valor de R² debe ser ≥ 0,98. Si se realiza una representación gráfica en papel, los puntos deben formar una línea recta.

Distribución típica de las muestras del análisis

LS1 - LS5 - Patrones de lactoferrina, S1 - S18 - Muestras a las diluciones 1/100 y 1/1000

	1	2	3	4	5	6
A	NC	PC(200)	S3(100)	S3(1000)	S11(100)	S11(1000)
B	LS1	LS1	S4(100)	S4(1000)	S12(100)	S12(1000)
C	LS2	LS2	S5(100)	S5(1000)	S13(100)	S13(1000)
D	LS3	LS3	S6(100)	S6(1000)	S14(100)	S14(1000)
E	LS4	LS4	S7(100)	S7(1000)	S15(100)	S15(1000)
F	LS5	LS5	S8(100)	S8(1000)	S16(100)	S16(1000)
G	S1(100)	S1(1000)	S9(100)	S9(1000)	S17(100)	S17(1000)
H	S2(100)	S2(1000)	S10(100)	S10(1000)	S18(100)	S18(1000)

Valores típicos de absorbancia (OD₄₅₀) para la curva del patrón de lactoferrina



CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Los resultados de este gráfico se determinaron utilizando un análisis del tipo de tendencia/regresión lineal. Otros métodos de reducción de datos pueden aportar resultados ligeramente diferentes.

1. Se debe utilizar un programa informático adecuado para la reducción de datos, con análisis del tipo de tendencia/regresión lineal, para realizar una estimación óptima de los valores de las muestras. Si no se dispone de programa informático, se pueden representar los datos utilizando papel de gráficos.
2. Seleccionar la muestra más diluida que proporciona un valor de OD₄₅₀ o de OD_{450/620} comprendido dentro de la curva del patrón y un valor de OD $\geq 0,100$ o 0,060, respectivamente. Si ambas diluciones de la muestra tienen lecturas de absorbancia mayores que la concentración máxima del patrón, repetir utilizando diluciones 1:10 adicionales. Por el contrario, se repetirá el análisis de toda muestra que tenga una lectura de absorbancia menor que la concentración mínima del patrón, utilizando la dilución 1:10, registrando el resultado como $<1 \mu\text{g/g}$ de peso húmedo si se obtiene un resultado negativo.
3. Representar los valores promedios de la absorbancia de los *Patrones* en el eje "y" respecto a la concentración en el eje "x".
4. Realizar el análisis del tipo de tendencia/regresión lineal y determinar si el valor R^2 es $\geq 0,98$.
5. Indicar al programa que genere la ecuación de la línea representada. Esta debe corresponder a la ecuación de una línea donde $Y = MX + B$, donde $Y = \text{OD}_{450}$ o $\text{OD}_{450/620}$ de la muestra, M = pendiente, B = Y-ordenada en el origen, y X = concentración de la muestra desconocida.
6. Resolver la X de la ecuación para determinar la concentración de lactoferrina en la muestra.
7. Multiplicar el valor de la muestra desconocida por el factor de dilución.
8. Dividir entre 1000 para transformar ng/ml en $\mu\text{g/ml}$ (aproximadamente $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo).

Ejemplo

1. Se ha generado un gráfico utilizando los datos proporcionados en la sección de control de calidad de este prospecto.
2. El análisis lineal del gráfico generó la siguiente ecuación: $y = 0,0072x - 0,0119$, con un valor R^2 de 0,99.
3. Se escogió para el análisis la dilución 1:1000 de la muestra nº 2, con un valor de absorbancia de 0,450.
4. Al despejar se obtiene que $X = 64 \text{ ng/ml}$.
5. Si se multiplica por el factor de dilución: $64 \times 1000 = 64.000 \text{ ng/ml}$.
6. Se transforma en $\mu\text{g/g}$ dividiendo entre 1000: $64.000 / 1000 = 64 \mu\text{g/g}$ de peso húmedo.

INTERPRETACIÓN DE LOS VALORES

Nivel de Lactoferrina en heces	Interpretación de los resultados
De 0 a 7,24 µg/mL (g) heces	Basal (normal)
≥7,25 µg/mL (g) heces	Elevado

PERÍODO DE VALIDEZ Y CONSERVACIÓN

La fecha de caducidad se indica en la etiqueta exterior del kit. 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 a entre 2 °C y 8 °C y debe reintegrarse al frigorífico tan pronto como sea posible después de su uso.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Se realizó un estudio clínico multicéntrico (3 centros) para evaluar el nivel de lactoferrina fecal en 180 pacientes con SCI y EI (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) y se comparó con 56 personas sanas. Se determinó la presencia de enfermedad activa en los pacientes utilizando el índice de actividad de Harvey Bradshaw (HBAI) y se obtuvieron muestras fecales para el análisis de lactoferrina. Los pacientes con SCI tenían unos niveles de lactoferrina similares a los de las personas sanas de control ($p>0,999$). Los niveles de lactoferrina fecal fueron significativamente mayores en los pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa que en los controles sanos ($p<0,05$, $p<0,0006$). Un número considerable de pacientes definidos como inactivos utilizando el índice HBAI presentaban niveles elevados de lactoferrina fecal que indicaban inflamación intestinal. En la Tabla 1 y la Tabla 2 se presentan los niveles de lactoferrina fecal de la población del estudio y el análisis estadístico de los resultados del test LACTOFERRIN SCAN® en comparación con el índice HBAI, respectivamente.

Tabla 1. Niveles de lactoferrina fecal de la población del estudio

Población del estudio N=235	N.º de muestras	Lactoferrina Fecal (µg/mL, media ± EE)
CU inactiva	41	65,65 ± 24,20
CU activa	31	1814,89 ± 788,25
EC inactiva	26	239,41 ± 82,73
EC activa	51	672,11 ± 241,79
SCI	31	1,27 ± 0,29
Personas sanas	55	1,55 ± 0,41

Tabla 2. Resultados del test LACTOFERRIN SCAN® para distinguir la enfermedad inflamatoria intestinal activa del síndrome del colon irritable/personas sanas

N = 178	ElI activo basada en un índice HBAI ≥ 4	SCI (31)/personas sanas (55) según la autoevaluación u evaluación clínica
Resultado elevado del test LACTOFERRIN SCAN®	75	3
Resultado basal del test LACTOFERRIN SCAN®	17	83

Sensibilidad	81,5%
Especificidad	96,5%
Valor Predictivo Positivo	96,2%
Valor Predictivo Negativo	83,0%
Correlación	88,8%

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El test LACTOFERRIN SCAN® es una prueba cuantitativa que mide los niveles de lactoferrina fecal liberada por los leucocitos. Es posible que la prueba no sea adecuada en personas inmunocomprometidas. Se excluirán del uso del test LACTOFERRIN SCAN® 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 concentraciones de lactoferrina fecal no deben interpretarse como una evidencia absoluta de la presencia de una enfermedad gastrointestinal. La predicción de una enfermedad activa o inactiva debe basarse en una evaluación clínica completa del paciente que también puede incluir varias determinaciones sobre el nivel de lactoferrina fecal.
3. Por el momento, no se ha evaluado clínicamente el uso del test LACTOFERRIN SCAN® 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. 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 consiguiente, al evaluar a un paciente se deben interpretar los hallazgos de la evaluación clínica junto con los resultados del test LACTOFERRIN SCAN®.
6. En las muestras clínicas se pueden observar niveles elevados de lactoferrina fecal. Las muestras de deben diluir de forma seriada hasta que el valor de la absorbancia esté comprendido dentro de la curva del patrón de lactoferrina.
7. 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 LACTOFERRIN SCAN®. En el análisis se evaluaron cultivos de caldo mixtos con *Diluyente* 1x. Se utilizaron cultivos de caldo en fase logarítmica que contenían $\geq 10^8$ bacterias por ml. Los microorganismos no reactivos en el test LACTOFERRIN SCAN® son los siguientes:

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

EFFECTO DE LA CONSISTENCIA DE LA MUESTRA FECAL

No se observaron diferencias entre las muestras fecales de consistencia líquida, semi-sólida o sólida cuando se compararon los resultados del test LACTOFERRIN CHEK® y/o con las evaluaciones clínicas de la actividad de la enfermedad.

REPRODUCIBILIDAD Y PRECISIÓN

La variación interanalítica se determinó analizando cuantitativamente 9 muestras fecales durante un periodo de 3 días. El CV porcentual osciló entre el 12,0% y el 47,7%, con un valor medio del 33,5% en las muestras con resultado positivo. La variación intranalítica se determinó analizando cuantitativamente 9 muestras fecales utilizando 4 repeticiones en un lote de kits. El CV porcentual osciló entre el 7,9% y el 16,0%, con un valor medio del 12,0% en las muestras con resultado positivo.

VERWENDUNGSZWECK

Der LACTOFERRIN SCAN® Test ist ein quantitativer ELISA zur Messung der Lactoferrinkonzentration im Stuhl, einem Marker für Leukozyten im Stuhl. Eine erhöhte Konzentration ist ein Indikator für Darmentzündung. Der Test dient als Hilfsmittel zur *in-vitro*-Diagnose für die Unterscheidung zwischen Patienten mit aktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED) und Patienten mit aktivem nicht entzündlichem Reizdarmsyndrom (RDS).

Achtung: Gemäß US-Bundesgesetz ist der Verkauf dieses Produkts an Ärzte bzw. auf Anordnung eines Arztes beschränkt.

ERKLÄRUNG

Schätzungen gehen davon aus, dass 1-2 Mio. Menschen in den USA an chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED) leiden (1). Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sind die wichtigsten Untergruppen von CED. Beide stehen mit einer chronischen Entzündung nicht infektiöser Ätiologie in Verbindung. Im Falle chronischer Darmerkrankungen muss infektiöse Diarrhoe – die mit einer Darmentzündung verbunden sein kann – ausgeschlossen werden, um eine CED-Diagnose (z. B. durch *Shigella*, *Campylobacter* und *Clostridium difficile* verursacht) bestätigen zu können (9). Colitis ulcerosa und Morbus Crohn weisen zwar eine Reihe von Unterschieden auf, u. A. Lokalität und Komplikationen, beide weisen jedoch Krankheitsstadien auf, die zwischen Aufflammen und Remission schwanken. Während der aktiven Erkrankung infiltrieren Leukozyten die Darmschleimhaut und erhöhen so die Lactoferrinkonzentration im Stuhl (2-10). CED-Patienten mit aktiver Erkrankung können Symptome aufweisen, die einer anderen chronischen Erkrankung, dem Reizdarmsyndrom (RDS) ähneln, einem nicht entzündlichen Leiden, von dem ca. 20 Mio. Menschen in den USA betroffen sind, was eine Diagnose im frühen Krankheitsstadium schwierig macht (1). Personen mit RDS weisen bei der endoskopischen Untersuchung einen normalen Darm auf, es sind keine Leukozyten in der Schleimhaut vorhanden und die Lactoferrinkonzentration im Stuhl ist nicht erhöht (6). Bei Verdacht auf Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sind Koloskopie und Barium-Röntgen die gängigsten Untersuchungsverfahren für die Bestätigung einer Darmentzündung und Geschwürbildung (2). Ein nicht-invasiver quantitativer Test wie der LACTOFERRIN SCAN® Test bestätigt eine aktive Darmentzündung und dient dem Arzt als Hilfsmittel bei der Unterscheidung zwischen RDS und CED.

TESTPRINZIP

Der LACTOFERRIN SCAN® 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 werden Standards und Reihenverdünnungen von Stuhlproben in die Kavitäten der Mikrotiterplatte übertragen. Wenn nachweisbare Lactoferrinkonzentrationen in der Probe vorhanden sind, bindet das Lactoferrin an den immobilisierten Antikörper. Nach der Inkubation werden die Kavitäten gewaschen und das Antikörperkonjugat hinzugefügt. Das *Konjugat* bindet an das während der ersten Inkubationsphase gebundene Lactoferrin. Nicht gebundenes Material wird während einer zweiten Reihe 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. Die gemessene Absorption ist direkt proportional zur vorhandenen Lactoferrinkonzentration. Zur Erstellung einer Standardkurve werden Lactoferrin-Standards zwischen 6,25 und 100 ng/ml verwendet. Mittels Auftragen der Absorptionswerte gegen die Lactoferrinkonzentrationen kann die Lactoferrinkonzentration in einer Testprobe bestimmt werden.

REAGENZIEEN

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).*

Signalwort: Warnung

H373: Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition P260, P314, P501



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).

LS1 - 5

Standards, je 1,5 ml LS1 (100 ng/mL), LS2 (50 ng/mL), LS3 (25 ng/mL), LS4 (12,5 ng/mL) und LS5 (6,25 ng/mL) – menschliche Lactoferrin-Standards in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal*

CONTROL +

Positive Kontrolle, 1,5 ml (10 µg/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).*

Signalwort: Warnung

H373: Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition P260, P314, P501



H₂SO₄ 0.6N

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

Signalwort: Gefahr

H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501



MA PLT

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

*enthält Quecksilber



VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Rx Only - Verschreibungspflichtig
2. Reagenzien aus verschiedenen Kits nicht mischen. Verwenden Sie das Kit nicht nach dem Verfallsdatum.
3. Reagenzien vor Gebrauch aus der Packung nehmen und auf Raumtemperatur bringen.
4. Verschlüsse und Spitzen sind farbkodiert; nicht vertauschen!
5. Alle Reagenzien vor dem Dispensieren vorsichtig mischen.
6. Achten Sie beim Umgang mit den Kavitäten darauf, diese nicht zu verkratzen, da dies zu erhöhten Absorptionsmesswerten führen kann.
7. Halten Sie die Tropfflaschen senkrecht, um die richtige Tropfengröße sicherzustellen.
8. Behandeln Sie die Proben und gebrauchten Kavitäten als infektiöses Material. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Handschuhe.
9. Nicht verwendete Kavitäten der Mikrotiterplatte müssen mit Trockenmittel zurück in den wiederverschließbaren Folienbeutel gegeben werden, damit sie vor Feuchtigkeit geschützt sind.
10. Führen Sie das Waschverfahren nach Anweisung durch, um starke Hintergrundreaktionen zu vermeiden.
11. Verwenden Sie Stuhlproben innerhalb von 2 Wochen nach Entnahme, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Gefrorene Proben (-20 °C oder niedriger) können bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen an Aktivität verlieren.

12. Messen Sie die Stuhlproben sorgfältig ab, um eine korrekte Verdünnung sicherzustellen. Schwer zu messende Proben müssen gewogen werden.
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.
16. Die *positive Kontrolle* und die *Standards* (LS1-5) enthalten 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.
17. Der 10-fache *Verdünnungspuffer* und das 20-fache *Waschpufferkonzentrat* enthalten 0,2 % Thimerosal als Konservierungsmittel. Sobald sie auf normale Gebrauchs-konzentration verdünnt sind, werden diese Lösungen als ungefährlich eingestuft. Die *Stopplösung* enthält 0,6 N Schwefelsäure. Bei Kontakt sofort mit Wasser abspülen. 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.
18. Befolgen Sie Ihre nationalen, regionalen und lokalen Verordnungen in Bezug auf die Abfallentsorgung. Nicht zum Hausmüll geben, als gefährlichen Abfall entsorgen.

VORBEREITUNGEN

1. Nehmen Sie alle Reagenzien aus der Packung, und lassen Sie sie vor Gebrauch Raumtemperatur annehmen.
2. **Bereiten Sie 1X-Waschlösung zu.** Die *Waschlösung* wird als 20X-Konzentrat geliefert (möglicherweise ist ein Präzipitat sichtbar). Mischen und verdünnen Sie es 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 1x-Verdünnungspuffer zu.** Der *Verdünnungspuffer* wird als 10x-Konzentrat geliefert (möglicherweise ist ein Präzipitat sichtbar). Mischen und verdünnen Sie es 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 Kavitäten, die mit Lactoferrin-spezifischem polyklonalem Antikörper beschichtet sind. Für jede Probe bzw. Kontrolle ist eine dieser beschichteten Kavitäten erforderlich. Berühren Sie nicht den Boden der Kavitäten, da dieser das optische Fenster für das ELISA-Lesegerät darstellt. Nicht verwendete Mikrotiterplattenkavitäten müssen zurück in den Folienbeutel gegeben und mit Trockenmittel gut verschlossen werden.

PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG DER VERDÜNNUNGEN

BITTE BEACHTEN: Sammeln Sie die Stuhlprobe in einem sauberen, luftdichten Behälter ohne Konservierungsstoffe. Lagern Sie die Proben zwischen 2 °C 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.

Zubereitung der verdünnten Proben:

1. Bereiten Sie für jede zu testende Probe drei Kunststoffreagenzröhrchen vor. Beschriften Sie die Reagenzröhrchen mit Nr.1 bis Nr.3. Geben Sie mithilfe einer Pipette für jede Probe 450 µl des 1x-*Verdünnungspuffers* in jedes der drei Reagenzröhrchen. Messen Sie mit einer Transferpipette 50 µl Stuhl (Probenüberschuss von der Pipettenspitze wischen) ab und geben Sie die Menge in Reagenzröhrchen Nr. 1. Entsorgen Sie die Transferpipette nach der ersten Probenverdünnung. **Flüssige/weiche Stuhlproben** - Geben Sie mit einer Transferpipette vorsichtig 50 µl (erste Markierung bzw. Ende der konisch erweiterten Spitze) der Stuhlprobe in das Reagenzröhrchen Nr. 1 (1:10 Probenverdünnung) und mischen Sie gut mit einem Vortex-Schüttler. Messen Sie die Stuhlproben sorgfältig ab, um eine korrekte Verdünnung sicherzustellen. **Halbfeste/feste Stuhlproben** – Wiegen Sie 0,05 g ab oder füllen Sie die konisch erweiterte Spitze der Transferpipette (50 µl, siehe Diagramm unten), geben Sie die Stuhlprobe in das Reagenzröhrchen Nr. 1 (1:10 Probenverdünnung), und mischen Sie gut mit einem Vortex-Schüttler. Messen Sie die Stuhlproben sorgfältig ab, um eine korrekte Verdünnung sicherzustellen.

Transferpipette:



2. Übertragen Sie mithilfe einer neuen Transferpipette 50 µl von Reagenzröhrchen Nr. 1 in Reagenzröhrchen Nr. 2 und vortexen Sie (1:100 Probenverdünnung).
3. Übertragen Sie mit derselben Transferpipette 50 µl von Reagenzröhrchen Nr. 2 in Reagenzröhrchen Nr. 3 und vortexen Sie (1:1.000 Probenverdünnung).

Zubereitung der positiven Kontrolle:

4. Bereiten Sie zwei Kunststoffreagenzröhrchen für die *positive Kontrolle* vor. Fügen Sie mithilfe einer kalibrierten Pipette 450 µl 1x-*Verdünnungspuffer* in Reagenzröhrchen Nr. 1 und 950 µl in Reagenzröhrchen Nr. 2 hinzu.
5. Übertragen Sie 50 µl *positive Kontrolle* in Reagenzröhrchen Nr. 1 (1:10 Verdünnung der *positiven Kontrolle*) und mischen Sie gut mit einem Vortex-Schüttler. Übertragen Sie mithilfe einer kalibrierten Pipette 50 µl von Reagenzröhrchen Nr. 1 in Reagenzröhrchen Nr. 2 (1:200 Verdünnung der *positiven Kontrolle*).
6. Vortexen Sie alle Reagenzröhrchen 10 Sekunden und lagern Sie sie bis zur Durchführung des ELISA zwischen 2 °C und 8 °C. Vortexen Sie erneut, bevor Sie die verdünnten Proben und die *positive Kontrolle* in die Mikrotiterplattenkavitäten übertragen. Damit ist eine gründliche Durchmischung der Proben und Kontrollen gewährleistet.

TESTVERFAHREN

Packungsinhalt

2 Kunststoff-Klebebögen

100 Transferpipetten

Benötigte, aber nicht enthaltene Materialien

Spritzflasche für 1x-*Waschlösung*

Vortex-Schüttler

Kühlschrank für die Lagerung

Reagenzröhrchen zur Probenverdünnung

Abfallbehälter/Saugpapier

Flasche für 1x-*Verdünnungspuffer*

Destilliertes oder entionisiertes Wasser

Inkubator auf 37 °C ± 2 °C eingestellt

ELISA-Lesegerät (450 nm oder 450/620 nm)

1. Verwenden Sie 2 Kavitäten je *Standard*, 1 Kavität für die negative Kontrolle (1x-*Verdünnungspuffer*), 1 Kavität für die 1:200 Verdünnung der *positiven Kontrolle* und je 1 Kavität für die Probenverdünnungen 1:100 und 1:1000. Siehe Tabelle unter QUALITÄTSKONTROLLE für ein Beispiel zur Anordnung der Kavitäten.
2. Geben Sie mithilfe einer kalibrierten Pipette je 100 µl der *Standards* LS1-LS5 in die doppelten Kavitäten sowie 100 µl 1x-*Verdünnungspuffer* und *positive Kontrolle* in die dafür bestimmten Kavitäten.
3. Geben Sie 100 µl von jeder Probenverdünnung (1:100 und 1:1000) in separate Kavitäten.
4. Schneiden Sie den Kunststoffklebebogen so zurecht, dass er die Kavitäten abdeckt. Decken Sie die Kavitäten ab und inkubieren Sie stehend bei 37 °C ± 2 °C 30 Minuten lang.
5. Schütteln Sie den Inhalt der Mikrokavitäten in eine Abfallschale aus.
6. Waschen Sie jede Kavität 5 Mal mit der 1X-*Waschlösung* aus einer Spritzflasche mit feiner Düse, indem Sie die *Waschlösung* jeweils kraftvoll auf den Boden der Kavität richten (d.h. Kavitäten füllen, dann *Waschlösung* aus den Kavitäten in eine Abfallschale schütteln). Schlagen Sie die umgedrehte Platte gegen ein trockenes Papiertuch, und wiederholen Sie die Waschschriffe **vier Mal**, wobei Sie jedes Mal ein trockenes Papiertuch verwenden. Wenn in den Kavitäten Partikel sichtbar sind, fahren Sie mit dem Waschen fort, bis alle Partikel entfernt sind.
7. Geben Sie einen Tropfen *Konjugat* (roter Verschluss) in jede Kavität. Inkubieren Sie die Kavitäten stehend 30 Minuten lang bei 37 °C ± 2 °C.
8. Wiederholen Sie Schritt Nr. 6. *Entsorgen Sie die Papiertücher und Probengefäße ordnungsgemäß.*
9. Geben Sie 2 Tropfen *Substrat* (blauer Verschluss) in jede Kavität. Klopfen Sie zum Mischen des Inhalts sanft gegen die Kavitäten. Inkubieren Sie die Kavitäten 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur. Klopfen Sie während der Inkubationszeit 1 oder 2 Mal sanft gegen die Kavitäten.
10. Geben Sie 1 Tropfen *Stopplösung* (gelber Verschluss) in jede Kavität. Klopfen Sie zum Mischen sanft gegen die Kavitäten, 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 oder 450/620 nm mit einem ELISA-Lesegerät gemessen wird. Wischen Sie vor Messung der optischen Dichte die Unterseite jeder Kavität mit einem weichen Papiertuch ab. Lesen Sie innerhalb von zwei bis zehn Minuten nach Zugabe der *Stopplösung* ab.
11. Messen Sie die Absorptionswerte für die positive Kontrollverdünnung, die negative Kontrolle, jede Probenverdünnung sowie für die Standards.
12. Mitteln Sie die akzeptablen Messwerte der doppelten Kavitäten vor der Interpretation der Ergebnisse.

QUALITÄTSKONTROLLE

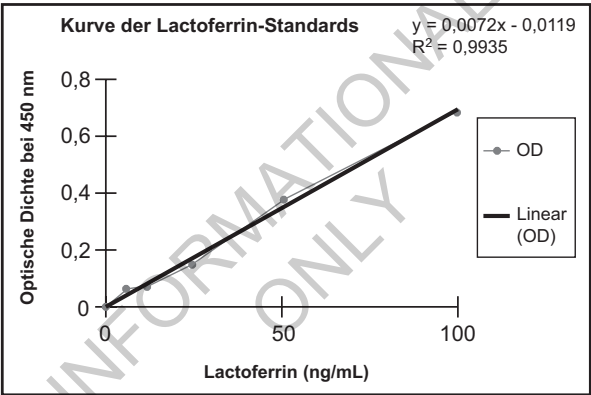
Die negative Kontrolle mit 1x-*Verdünnungspuffer* muss eine optische Dichte bei 450 <0,100 bzw. bei 450/0,060 <0,060 aufweisen. Die kalkulierte Konzentration für die positive Kontrolle muss im Bereich zwischen $10 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ liegen. Die typische Anordnung und die Werte für Standards und Proben sind in folgender Tabelle und Graphik dargestellt. Nach der linearen Trend-/Regressionsanalyse muss der R^2 -Wert $\geq 0,98$ sein. Bei Verwendung von Millimeterpapier müssen die Punkte eine gerade Linie ergeben.

Typische Anordnung für Testproben

LS1 - LS5 – Lactoferrin-Standards P1 - P18 – Proben mit Verdünnung 1/100 und 1/1000

	1	2	3	4	5	6
A	NC	PC(200)	S3(100)	S3(1000)	S11(100)	S11(1000)
B	LS1	LS1	S4(100)	S4(1000)	S12(100)	S12(1000)
C	LS2	LS2	S5(100)	S5(1000)	S13(100)	S13(1000)
D	LS3	LS3	S6(100)	S6(1000)	S14(100)	S14(1000)
E	LS4	LS4	S7(100)	S7(1000)	S15(100)	S15(1000)
F	LS5	LS5	S8(100)	S8(1000)	S16(100)	S16(1000)
G	S1(100)	S1(1000)	S9(100)	S9(1000)	S17(100)	S17(1000)
H	S2(100)	S2(1000)	S10(100)	S10(1000)	S18(100)	S18(1000)

Typische Absorptionswerte (OD450) für die Lactoferrin-Standardkurve



BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse dieser Packungsbeilage wurden mittels linearer Trend-/Regressionsanalyse ermittelt. Andere Datenreduktionsverfahren führen möglicherweise zu leicht unterschiedlichen Ergebnissen.

1. Zur optimalen Kalkulation der Probenwerte sollte ein angemessenes Datenreduktionsprogramm mit linearer Trend-/Regressionsanalyse verwendet werden. Ist kein Computerprogramm verfügbar, so können die Daten auf ein Millimeterpapier aufgetragen werden.
2. Wählen Sie die am stärksten verdünnte Probe, die einen OD450- bzw. OD450/620-Wert innerhalb der Standardkurve und $OD \geq 0,100$ bzw. $0,060$ ergibt. Sollten beide Probenverdünnungen höhere Absorptionswerte als die höchste Standardkonzentration aufweisen, so wiederholen Sie den Vorgang mit zusätzlichen 1:10 Verdünnungen. Umgekehrt muss eine Probe mit einem Absorptionswert unter der niedrigsten Standardkonzentration erneut mit der 1:10 Verdünnung getestet und bei negativem Ergebnis als $<1 \mu\text{g/g}$ Nassgewicht aufgezeichnet werden.
3. Tragen Sie die mittleren Absorptionswerte der *Standards* auf der Y-Achse gegen die Konzentration auf der X-Achse auf.
4. Führen Sie die lineare Trend-/Regressionsanalyse aus und stellen Sie fest, ob der R^2 -Wert $\geq 0,98$ ist.

5. Weisen Sie das Programm an, die Gleichung für die aufgetragene Linie zu erstellen. Die Gleichung sollte der Gleichung einer Linie $Y = MX + B$ entsprechen, wobei gilt: $Y = OD450$ bzw. $OD450/620$ der Probe, $M = \text{Anstieg}$, $B = Y\text{-Achsenabschnitt}$ und $X = \text{Konzentration der unbekannten Probe}$.
6. Lösen Sie die Gleichung für X , um die Lactoferrinkonzentration in der Probe zu bestimmen.
7. Multiplizieren Sie den Wert der unbekannten Probe mit dem Verdünnungsfaktor.
8. Dividieren Sie durch 1000, um ng/ml in $\mu g/ml$ umzuwandeln (ca. $\mu g/g$ Nassgewicht).

Beispielrechnung

1. Anhand der Daten unter „Qualitätskontrolle“ dieser Packungsbeilage wurde ein Graph erstellt.
2. Die lineare Analyse des Graph ergab folgende Gleichung: $y = 0,0072x - 0,0119$ und $R^2\text{-Wert von } 0,99$.
3. Die 1:1000 Verdünnung der Probe Nr. 2 wurde für die Analyse mit einem Absorptionswert von 0,450 gewählt.
4. Auflösung nach X ergibt: $X = 64 \text{ ng/ml}$.
5. Multiplizieren Sie mit dem Verdünnungsfaktor: $64 \times 1000 = 64,000 \text{ ng/ml}$.
6. Wandeln Sie mittels Dividieren durch 1000 in $\mu g/g$ um: $64,000 / 1000 = 64 \mu g/g$ Nassgewicht.
7. Stuhlproben von gestillten Säuglingen dürfen für diesen Test nicht verwendet werden.

INTERPRETATION DER WERTE

Lactoferrinkonzentration im Stuhl	Interpretation der Ergebnisse
0 bis 7,24 $\mu g/mL$ (g) Stuhl	normal
$\geq 7,25 \mu g/mL$ (g) Stuhl	Erhöht

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

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

LEISTUNGSDATEN

Im Rahmen einer multizentrischen Studie (3 Standorte) wurden Lactoferrinkonzentrationen im Stuhl bei 180 Patienten mit RDS und CED (Colitis ulcerosa und Morbus Crohn) evaluiert und mit 56 gesunden Personen verglichen. Die Patienten wurden mittels Harvey-Bradshaw-Activity-Index (HBAI) auf eine aktive Erkrankung untersucht, Stuhlproben wurden für eine Lactoferrin-Analyse entnommen. Patienten mit RDS wiesen ähnliche Lactoferrinkonzentrationen wie die gesunden Kontrollpersonen auf ($p > 0,999$). Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wiesen im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen signifikant höhere Lactoferrinkonzentrationen auf ($p < 0,05$, $p < 0,0006$). Eine beträchtliche Anzahl an Patienten, die mittels HBAI als inaktiv bestimmt wurden, hatten erhöhte Lactoferrinwerte im Stuhl, ein Hinweis auf eine Darmentzündung. Die Lactoferrinkonzentrationen der Studienpopulation sowie die statistische Analyse der Ergebnisse aus dem LACTOFERRIN SCAN® Test im Vergleich zum HBAI sind in Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1. Lactoferrinkonzentrationen der Studienpopulation

Studienpopulation Anzahl = 235	No. Anzahl der Proben muestras	Lactoferrin im Stuhl (mittl. µg/mL ± SE)
Inaktive CU	41	65,65 ± 24,20
Aktive CU	31	1814,89 ± 788,25
Inaktive MC	26	239,41 ± 82,73
Aktive MC	51	672,11 ± 241,79
RDS	31	1,27 ± 0,29
Gesunde Personen	55	1,55 ± 0,41

Tabelle 2. Ergebnisse des LACTOFERRIN SCAN® Tests zur Unterscheidung von aktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung und Reizdarmsyndrom/gesunden Personen

N = 178	Aktive CED nach HBAI-Bewertung ≥4	RDS (31)/Gesunde Personen (55) nach klinischer und Selbstbewertung
LACTOFERRIN SCAN® Test Erhöht	75	3
LACTOFERRIN SCAN® Test, Normal	17	83

Sensitivität	81,5%
Spezifität	96,5%
Positiver Vorhersagewert	96,2%
Negativer Vorhersagewert	83,0%
Korrelation	88,8%

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Der LACTOFERRIN SCAN® Test ist ein quantitativer Test zur Messung der Lactoferrinkonzentration aus Leukozyten im Stuhl. Der Test ist möglicherweise nicht für immungeschwächte Personen geeignet. Proben folgender Patienten sollten nicht mit dem LACTOFERRIN SCAN® 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. Lactoferrinkonzentrationen im Stuhl dürfen nicht als absoluter Beweis für das Vorhandensein einer Magen-Darm-Erkrankung interpretiert werden. Die Prognose einer aktiven und inaktiven Erkrankung muss auf einer vollständigen klinischen Untersuchung des Patienten beruhen, zu der auch mehrere Bestimmungen der Lactoferrinwerte im Stuhl zählen können.
3. Bis dato wurde der LACTOFERRIN SCAN® Test noch nicht klinisch für den Nachweis von Leukozyten in anderen klinischen Probenformen evaluiert. Verwenden Sie ihn 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. Andere Darmleiden, u. A. zahlreiche Magen-Darm-Infektionen und kolorektales Karzinom, führen oft zu erhöhten Lactoferrinwerten in Stuhlproben. Daher muss bei der Evaluierung des Patienten gemeinsam mit den Ergebnissen des LACTOFERRIN SCAN® Tests auch eine klinische Untersuchung miteinbezogen werden.
6. Klinische Stuhlproben können hohe Lactoferrinkonzentrationen aufweisen. Nehmen Sie eine Reihenverdünnung der Proben vor, bis der Absorptionswert innerhalb der Lactoferrin-Standardkurve fällt.

KREUZREAKTIVITÄT

Verschiedene im Darm angesiedelte Organismen wurden mit dem LACTOFERRIN SCAN® Test auf Kreuzreaktivität untersucht. Für die Analyse wurden mit 1x-Verdünnungsspuffer vermischte Bouillonkulturen evaluiert. Es wurden Bouillonkulturen in der Protokollphase mit $\geq 10^8$ Bakterien/ml verwendet. Folgende Organismen reagierten nicht im LACTOFERRIN SCAN® Test:

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

AUSWIRKUNGEN DER STUHLPROBENKONSISTENZ

Beim Vergleich mit den Ergebnissen aus dem LACTOFERRIN CHEK® Test und/oder klinischen Untersuchungen auf Krankheitsaktivität wurde kein Unterschied zwischen Stuhlproben mit flüssiger, halbfester oder fester Konsistenz festgestellt.

REPRODUZIERBARKEIT UND PRÄZISION

Die Inter-Assay-Variation wurde mittels quantitativer Analyse von 9 Stuhlproben in einem Zeitraum von 3 Tagen bestimmt. Der VK lag zwischen 12,0% und 47,7% mit einem Mittelwert von 33,5% für positive Proben. Die Intra-Assay-Variation wurde mittels quantitativer Analyse von 9 Stuhlproben unter Verwendung von 4 Replikaten in einer Kitcharge bestimmt. Der VK lag zwischen 7,9% und 16,0% mit einem Mittelwert von 12,0% für positive Proben.

LACTOFERRIN SCAN® - FRANCAIS

UTILISATION PRÉVUE

Le test LACTOFERRIN SCAN® est un dosage immunoenzymatique (ELISA) quantitatif destiné à mesurer les taux de lactoferrine fécale, marqueur des leucocytes fécaux. Un taux élevé de lactoferrine est un indicateur d'inflammation intestinale. Ce test peut être utilisé comme outil diagnostique in vitro pour distinguer les patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) active des patients souffrant du syndrome du côlon irritable, qui n'est pas d'origine inflammatoire.

Attention: la loi fédérale américaine limite la vente de ce dispositif aux médecins ou sur prescription médicale.

EXPLICATION

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) affecteraient de 1 à 2 millions de personnes aux États-Unis (1). La recto-colite hémorragique et la maladie de Crohn sont les principaux sous-groupes de MICI et impliquent toutes deux une inflammation chronique d'étiologie non infectieuse. Dans les cas de maladies intestinales chroniques, la diarrhée infectieuse, qui peut impliquer une inflammation intestinale, doit être éliminée pour confirmer le diagnostic de MICI (par ex. causée par *Shigella*, *Campylobacter* ou *Clostridium difficile*) (9). Bien que la recto-colite hémorragique et la maladie de Crohn diffèrent en fonction des emplacements de la maladie et des complications, toutes deux alternent entre poussée et rémission. En phase active, les leucocytes infiltrant la muqueuse intestinale, augmentant le taux de lactoferrine fécale (2-10). Les patients atteints de MICI active peuvent présenter des symptômes similaires à une autre pathologie chronique, le syndrome du côlon irritable (SCI ou colopathie fonctionnelle), une pathologie non-inflammatoire qui toucherait non moins de 20 millions d'Américains, la rendant difficile à diagnostiquer dans les phases les plus précoces de la maladie (1). Chez les personnes atteintes de SCI, les intestins semblent normaux lors de l'examen endoscopique, les leucocytes sont absents de la muqueuse et les taux de lactoferrine fécale sont au niveau de base (6). En cas de suspicion de recto-colite hémorragique ou de maladie de Crohn, la coloscopie et la radiographie au baryum sont les techniques les plus courantes pour confirmer l'inflammation et l'ulcération intestinales (2). Un test quantitatif non invasif comme le test LACTOFERRIN SCAN® montre une inflammation intestinale active et fournit aux médecins un outil de diagnostic différentiel entre SCI et MICI.

PRINCIPE DU TEST

Le test LACTOFERRIN SCAN® 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. Lors du dosage, les étalons et les dilutions en série d'échantillons de selles sont transférés dans les micropuits. Si des concentrations détectables 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. Toute substance non liée est retirée lors d'une deuxième 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. L'absorbance mesurée est directement proportionnelle à la concentration de lactoferrine présente. Les étalons de lactoferrine allant de 6,25 à 100 ng/ml sont utilisés pour créer une courbe d'étalonnage. En traçant les valeurs d'absorbance par rapport aux concentrations de lactoferrine, la concentration de lactoferrine d'un échantillon peut être déterminée.

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).*

Mot indicateur : Avertissement

H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée P260, P314, P501



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).

LS1 - 5

Étalons, 1,5 ml de chaque, LS1 (100 ng/ml), LS2 (50 ng/ml), LS3 (25 ng/ml), LS4 (12,5 ng/ml) et LS5 (6,25 ng/ml) – étalons de lactoferrine humaine dans une solution de protéine tamponnée contenant 0,02 % de thimérosal*

CONTROL +

Contrôle positif, 1,5 ml (10 µg/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%)*.

Mot indicateur : Avertissement

H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée P260, P314, P501



H₂SO₄ 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.

Mot indicateur : Danger

H314 : Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires



P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501

MA PLT

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

*contient du mercure



PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Rx Only – Sur ordonnance uniquement
2. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés. Ne pas utiliser le kit si la date d'expiration est dépassée.
3. Les réactifs doivent être retirés de la boîte et laissés à température ambiante avant utilisation.
4. Les capsules et les embouts sont classés par couleur. Ne pas les mélanger !
5. Mélanger doucement tous les réactifs avant de les répartir.
6. Lors des manipulations, éviter d'effleurer le fond des micropuits, toute dégradation pouvant entraîner une lecture élevée de l'absorbance.
7. Tenir les compte-gouttes en position verticale de façon à dispenser des gouttes de taille adéquate.
8. Manipuler les échantillons et micropuits utilisés comme tout facteur potentiel de transmission d'agents infectieux. Utiliser des gants pour effectuer les tests.
9. Les micropuits non utilisés doivent être réintroduits dans leur emballage refermable contenant un dessiccateur pour les protéger de l'humidité.
10. Le lavage doit être réalisé suivant les consignes indiquées afin d'éviter toute réaction hors essai.

11. Pour obtenir des résultats optimaux, utiliser les échantillons fécaux dans un délai de deux semaines après leur prélèvement. Une congélation des échantillons (-20°C ou moins) peut leur faire perdre leur activité en raison de gels et dégels multiples.
12. Mesurer soigneusement les échantillons de selles pour s'assurer d'une dilution correcte. Les échantillons dont la mesure est difficile doivent être pesés.
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.
16. Les *Contrôles positifs* et les *Étalons* (LS1-5) contiennent de la lactoferrine, 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.
17. Le *Diluant 10X* et le *Tampon de lavage concentré 20X* contiennent du Thimérolal 0,2 % comme conservateur. Une fois diluées à une concentration normale d'utilisation, ces solutions sont classées comme non dangereuses. La *Solution d'arrêt* contient 0,6 N d'acide sulfurique. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. 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.
18. Respecter les arrêtés locaux, régionaux et nationaux relatifs aux réglementations sur l'élimination des déchets. Ne pas les jeter avec les déchets ménagers mais avec les matières dangereuses.

PREPARATIONS PRELIMINAIRES

1. Retirer tous les réactifs de la boîte pour les laisser atteindre la température ambiante avant de les utiliser.
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). La mélanger et la diluer en versant 50 ml de concentré dans 950 ml d'eau distillée 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 à 10X (un précipité peut être observé). Le mélanger et le diluer en versant 40 ml de concentré dans 360 ml d'eau distillée 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 en aluminium et ce dernier doit être fermé hermétiquement avec le dessiccateur.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS ET PRÉPARATION DE DILUTIONS

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 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.

Préparer des échantillons dilués :

1. Préparer trois tubes plastiques pour chaque échantillon de test. *Étiqueter les tubes 1 à 3.* Pour chaque échantillon, ajouter 450 µl de *Diluant* 1X dans chacun des trois tubes à l'aide d'une pipette. Au moyen d'une pipette de transfert, mesurer 50 µl de selles (essuyer l'échantillon en surplus de l'embout de la pipette) et les ajouter au tube 1. Jeter la pipette de transfert dès la dilution d'échantillon initiale. **Pour les échantillons de selles liquides / molles** – Au moyen d'une pipette de transfert, ajouter avec précaution 50 µl (premier repère ou haut de l'extrémité évasée) de l'échantillon dans le tube 1 (dilution de l'échantillon au 1/10) et bien mélanger à l'aide d'un agitateur vortex. Mesurer soigneusement l'échantillon pour s'assurer que la dilution est correcte. **Pour les échantillons de selles solides / formées** – Peser 0,05 g ou remplir l'embout évasé de la pipette de transfert (50 µl ; voir la figure ci-dessous) et l'ajouter dans le tube 1 (dilution de l'échantillon au 1/10) et bien mélanger à l'aide d'un agitateur vortex. Mesurer soigneusement l'échantillon pour s'assurer que la dilution est correcte.

Pipette de transfert :



2. Transférer 50 µl du tube 1 dans le tube 2 en utilisant une nouvelle pipette de transfert et agiter (dilution de l'échantillon au 1/100).
3. Transférer 50 µl du tube 2 dans le tube 3 en utilisant la même pipette de transfert (dilution de l'échantillon au 1/1000).

Préparation du Contrôle positif :

4. Préparer deux tubes plastiques pour le *Contrôle positif*. Ajouter 450 µl de *Diluant* 1X dans le tube 1 et 950 µl dans le tube 2 à l'aide d'une pipette calibrée.
5. Transférer 50 µl de *Contrôle positif* dans le tube 1 (dilution au 1/10 du *Contrôle positif*) et bien mélanger à l'aide d'un agitateur vortex. Transférer 50 µl du tube 1 dans le tube 2 à l'aide d'une pipette calibrée (dilution au 1/200 du *Contrôle positif*).
6. Agiter les tubes pendant 10 secondes et les conserver à une température comprise entre 2° et 8°C jusqu'à réalisation du test ELISA. Agiter une fois de plus avant de transférer les échantillons dilués et le *Contrôle positif* vers les micropuits. Cette opération garantit un bon mélange de l'échantillon et des contrôles.

PROCÉDURE DE TEST

Matériel fourni

2 Films adhésifs plastiques

100 pipettes de transfert

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

Bouteille de *Diluant* 1X

Eau distillée ou déionisée

Incubateur à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Lecteur ELISA (450 nm ou 450/620 nm)

1. Désigner et utiliser 2 puits pour chaque *Étalon*, 1 puits pour le contrôle négatif (*Diluant* 1X), 1 puits pour la dilution au 1/200 du *Contrôle positif* et 1 puits pour les dilutions d'échantillons au 1/100 et 1/1000. Voir le tableau sous CONTRÔLE DE LA QUALITÉ pour avoir des exemples d'emplacement des puits.
2. À l'aide d'une pipette calibrée, ajouter 100 µl de chaque *Étalon* LS1 à LS5 dans les puits en double et 100 µl du *Diluant* 1X et du *Contrôle positif* dans les puits indiqués.
3. Ajouter 100 µl de chaque dilution d'échantillon (1/100 et 1/1000) dans les différents puits.
4. Couper le film adhésif plastique à la taille nécessaire pour couvrir les puits. Couvrir les puits et les laisser incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 30 minutes en stationnaire.
5. Secouer le contenu hors des micropuits dans un réceptacle à déchets.
6. Nettoyer chaque micropuits 5 fois en projetant énergiquement la *Solution de lavage* 1X 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.
7. Ajouter une goutte de *Conjugué* (capsule rouge) dans chaque micropuits. Incuber les micropuits à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 30 minutes en stationnaire.
8. Répéter l'étape 6. *Éliminer les serviettes en papier et les récipients ayant contenu des échantillons de façon appropriée.*
9. 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.
10. Verser 1 goutte de *Solution d'arrêt* (capsule jaune) dans chaque micropuits. Tapoter légèrement pour mélanger 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 ou 450/620 nm sur un lecteur de *Microplaques* ELISA. Essuyer le dessous de chaque micropuits avec une serviette en papier avant de mesurer la densité optique. Effectuer la lecture entre deux et dix minutes après l'adjonction de la *Solution d'arrêt*.
11. Notez les valeurs d'absorbance pour la dilution du *Contrôle positif*, du contrôle négatif, pour chaque dilution d'échantillon et pour les étalons.
12. Faire la moyenne des résultats acceptables des puits en double avant d'interpréter les résultats.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Le puits de contrôle négatif contenant le *Diluant* 1X doit présenter une $\text{DO}_{450} < 0,100$ ou $\text{DO}_{450/620} < 0,060$. La concentration calculée du *Contrôle positif* doit correspondre à une récupération de 10 ± 3 µg/ml. Les valeurs et présentations types des étalons et échantillons sont présentées dans le tableau et le graphique suivants. Selon la régression linéaire

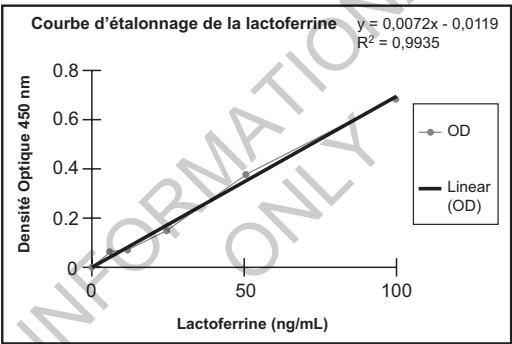
ou courbe de tendance, la valeur R^2 doit être $\geq 0,98$. Si du papier millimétré est utilisé, les points doivent former une ligne droite.

Présentation type des échantillons de test

LS1 - LS5 : étalons de lactoferrine S1 - S18 : échantillons dilués au 1/100 et 1/1000

	1	2	3	4	5	6
A	CN	CP(200)	S3(100)	S3(1000)	S11(100)	S11(1000)
B	LS1	LS1	S4(100)	S4(1000)	S12(100)	S12(1000)
C	LS2	LS2	S5(100)	S5(1000)	S13(100)	S13(1000)
D	LS3	LS3	S6(100)	S6(1000)	S14(100)	S14(1000)
E	LS4	LS4	S7(100)	S7(1000)	S15(100)	S15(1000)
F	LS5	LS5	S8(100)	S8(1000)	S16(100)	S16(1000)
G	S1(100)	S1(1000)	S9(100)	S9(1000)	S17(100)	S17(1000)
H	S2(100)	S2(1000)	S10(100)	S10(1000)	S18(100)	S18(1000)

Valeurs d'absorbance types (DO_{450}) pour la courbe d'étalonnage de la lactoferrine



CALCUL DES RÉSULTATS

Les résultats de cette notice ont été déterminés à l'aide d'une régression linéaire ou courbe de tendance. Les autres méthodes de réduction des données peuvent donner des résultats légèrement différents.

1. Pour estimer au mieux les valeurs d'échantillons, utiliser un programme informatique approprié de réduction des données avec régression linéaire. Si aucun programme informatique n'est disponible, les données peuvent être tracées sur un papier millimétré.
2. Choisir l'échantillon le plus dilué qui donne une valeur DO_{450} ou $DO_{450/620}$ dans la courbe d'étalonnage et $DO \geq 0,100$ ou $0,060$, respectivement. Si les deux dilutions d'échantillons ont des résultats d'absorbance supérieurs à la plus haute concentration de l'étalon, renouveler avec les dilutions au 1/10. Inversement, tout échantillon présentant un résultat d'absorbance inférieur à la concentration la plus faible de l'étalon doit être à nouveau testé avec la dilution au 1/10 et, en cas de résultat négatif, il doit être noté sous la forme $<1 \mu\text{g/g}$ poids humide.
3. Reporter les valeurs d'absorbance moyenne des Étalons sur l'axe des y et la concentration sur l'axe des x.
4. Exécuter la régression linéaire et déterminer si la valeur R^2 est $\geq 0,98$.

- Demander au programme de produire l'équation de la ligne tracée. L'équation doit correspondre à l'équation d'une ligne $Y = MX + B$, où $Y = DO_{450}$ ou $DO_{450/620}$ de l'échantillon, M = pente, B = intersection Y et X = concentration de l'échantillon inconnu.
- Résoudre l'équation pour X pour déterminer la concentration de lactoferrine dans l'échantillon.
- Multiplier la valeur de l'échantillon inconnu par le facteur de dilution.
- Diviser par 1000 pour convertir les ng/ml en $\mu\text{g/ml}$ (environ $\mu\text{g/g}$ de poids humide).

Exemple de calcul

- Un graphique a été produit à l'aide des données fournies dans la section Contrôle de la qualité de cette notice.
- L'analyse linéaire du graphique a produit l'équation suivante : $y = 0,0072x - 0,0119$ et une valeur R^2 de 0,99.
- La dilution au 1/1000 de l'échantillon n° 2 a été utilisée pour l'analyse avec une valeur d'absorbance de 0,450.
- La résolution de X donne : $X = 64 \text{ ng/ml}$.
- Multiplier par le facteur de dilution : $64 \times 1000 = 64\,000 \text{ ng/ml}$.
- Convertir en $\mu\text{g/g}$ en divisant par 1000 : $64\,000 / 1000 = 64 \mu\text{g/g}$ de poids humide.

INTERPRÉTATION DES VALEURS

Taux de lactoferrine dans les selles	Interprétation des Résultats
0 à 7,24 $\mu\text{g/mL}$ (g) selles	Base (normal)
$\geq 7,25 \mu\text{g/mL}$ (g) selles	Élevé

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

Une étude clinique multicentrique (3 sites) a été menée pour évaluer les taux de lactoferrine dans les selles chez 180 patients souffrant de SCI et de MICI (recto-colite hémorragique et maladie de Crohn) et les comparer à 56 sujets sains. L'indice de Harvey-Bradshaw a été utilisé pour déterminer l'activité clinique chez les patients examinés et des échantillons de selles ont été prélevés pour la recherche de lactoferrine. Les patients souffrant de SCI présentaient des taux de lactoferrine similaires à ceux des contrôles sains ($p > 0,999$). Les taux de lactoferrine fécale étaient significativement supérieurs chez les patients atteints de maladie de Crohn et de recto-colite hémorragique, par rapport aux contrôles sains ($p < 0,05$, $p < 0,0006$). Un nombre significatif de patients pour lesquels l'indice de Harvey-Bradshaw indiquait une inactivité clinique présentait une élévation du taux de lactoferrine fécale, signe d'inflammation intestinale. Les taux de lactoferrine fécale pour la population de l'étude et les résultats de l'analyse statistique du test LACTOFERRIN SCAN® par rapport à l'indice de Harvey-Bradshaw sont respectivement présentés dans le tableau 1 et le tableau 2.

Tableau 1. Taux de lactoferrine fécale de la population de l'étude

Population dl l'étude N = 235	Nb d'échantillons	Lactoferrine fécale (moyenne $\mu\text{g/mL} \pm \text{ES}$)
RCH Inactive	41	65,65 $\pm$ 24,20
RCHActive	31	1814,89 $\pm$ 788,25
MC Inactive	26	239,41 $\pm$ 82,73
MC Active	51	672,11 $\pm$ 241,79
SCI	31	1,27 $\pm$ 0,29
Sujets sains	55	1,55 $\pm$ 0,41

Tableau 2. Résultats du test LACTOFERRIN SCAN® pour le diagnostic différentiel de maladie inflammatoire chronique de l'intestin active et de syndrome du côlon irritable / sujets sains

N = 178	MICI active d'après indice de Harvey- Bradshaw ≥ 4	SCI (31)/sujets sains (55) d'après examen cliniques et personnel
LACTOFERRIN SCAN® test Élevé	75	3
LACTOFERRIN SCAN® test Normal	17	83

Sensibilité	81,5%
Spécificité	96,5%
Valeur Prédictive Positive	96,2%
Valeur Prédictive Négative	83,0%
Corrélation	88,8%

LIMITES DE LA PROCÉDURE

1. Le test LACTOFERRIN SCAN® est un test de dépistage quantitatif qui mesure les concentrations de lactoferrine fécale libérée par les leucocytes. Le test peut ne pas être approprié aux personnes immunodéficientes. Les échantillons des patients suivants doivent être exclus du test LACTOFERRIN SCAN® : 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 taux de lactoferrine fécale ne doivent pas être interprétés comme une preuve absolue de la présence d'une maladie gastro-intestinale. La prédiction de la maladie active ou inactive doit reposer sur un examen clinique complet du patient qui peut aussi inclure plusieurs déterminations du taux de lactoferrine fécale.
3. À ce jour, le test LACTOFERRIN SCAN® 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 thimérosal, de formol d'acétate de sodium ou d'alcool polyvinylique ne peuvent pas être utilisés.

5. D'autres troubles intestinaux, comme de nombreuses infections gastro-intestinales et les cancers colorectaux, entraînent souvent une augmentation de lactoferrine dans les échantillons de selles. En conséquence, lors de l'examen d'un patient, un examen clinique doit être pratiqué et pris en compte avec les résultats du test LACTOFERRIN SCAN®.
6. Des taux élevés de lactoferrine fécale peuvent être observés avec les échantillons cliniques. Les échantillons doivent être dilués en série jusqu'à ce que la valeur d'absorbance parvienne à la courbe d'étalonnage de la lactoferrine.
7. 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 LACTOFERRIN SCAN®. 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 $\geq 10^8$ bactéries par ml. Les organismes n'ayant pas réagi au test LACTOFERRIN SCAN® sont les suivants :

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

EFFET DE LA CONSISTANCE DE L'ÉCHANTILLON DE SELLES

Aucune différence n'a été constatée entre les échantillons de selles de consistance liquide, semi-solide ou solide vis-à-vis des résultats du test LACTOFERRIN CHEK® ou l'évaluation clinique pour l'activité de la maladie.

REPRODUCTIBILITÉ ET PRÉCISION

La variation inter-essais a été déterminée par l'analyse quantitative de 9 échantillons de selles sur une période de 3 jours. Le pourcentage du coefficient de variation allait de 12,0 % à 47,7 %, avec une valeur moyenne de 33,5 % pour les échantillons positifs. La variation intra-essai était déterminée par l'analyse quantitative de 9 échantillons de selles, chaque échantillon étant testé 4 fois avec un même lot de kits. Le pourcentage du coefficient de variation allait de 7,9 % à 16 %, avec une valeur moyenne de 12,0 % pour les échantillons positifs.

FOR INFORMATIONAL USE
ONLY

REFERENCES

1. 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.
2. Fine., K.D., F. Ogunji, J. George, M. Niehaus, and R.L. 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.
3. 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.
4. Harris, J. C., H. L. DuPont, and B. R. Hornick. 1971. Fecal leukocytes in diarrheal illness. *Ann. Intern. Med.* 76:697-703.
5. Huicho L., V. Garaycochea, N. Uchima, R. Zerpa, and R.L. Guerrant. 1997. Fecal lactoferrin, fecal leukocytes and occult blood in the diagnostic approach to childhood invasive diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16(7):644-647.
6. Kane, S., W. Sandborn, P. Rufo, A. Zholudev, J. Boone, D. Lyster, M. Camilleri, and S. Hanauer. 2003. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. *Am. J. Gastroenterol.* 98:1309-1314.
7. Kayazawa, M., O. Saitoh, K. Kojima, K. Nakagawa, S. Tanaka, K. Tabata, R. Maysuse, K. Uchida, M. Hoshimoto, I. Hirata, and K. Katsu. 2002. Lactoferrin in whole gut lavage fluid as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: Comparison with other neutrophil-derived proteins. *Am. J. Gastroenterol.* 97:360-369.
8. Parsi, M., B. Shen, J. Achkar, F. Remzi, J. Goldblum, J. Boone, D. Lin, J. Connor, V. Fazio, and B. Lashner. 2004. Fecal lactoferrin for the diagnosis of symptomatic patients with ileal pouch-anal anastomosis. *Gastroenterology* 126:1280-1286.
9. 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.
10. Sugi, K., O. I. Saitoh, and K. Katsu. 1996. Fecal lactoferrin as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: Comparison with other neutrophil-derived proteins. *Am. J. Gastroenterol.* 91:927-934.

FOR INFORMATIONAL USE
ONLY

Technical Support

Further information can be obtained from contacting TECHLAB® Technical Support:

US	+ 1 800 TECHLAB
Phone	(540) 953-1664
FAX	(540) 953-1665

LACTOFERRIN CHEK, LACTOFERRIN SCAN, the TECHLAB Logo, and TECHLAB are trademarks of TECHLAB, Inc.