

Laktoferrin ELISA Kit

Zur in-vitro-Bestimmung von Laktoferrin in Stuhl

For the in vitro determination of lactoferrin in stool

Gültig ab / Valid from 2015-01-07

REF K 6870



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	5
<i>Probenstabilität und -lagerung</i>	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Spike-Wiederfindung</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Spezifität</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Laktoferrin aus Stuhl geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Laktoferrin ist ein eisenbindendes Glykoprotein von 76 kD, welches in den sekundären Granula von Neutrophilen produziert und gespeichert wird. Zusätzlich ist es auch in vielen flüssigen Sekreten wie z. B. Milch, Speichel, Tränen und Nasensekret vorhanden.

Laktoferrin kann in verschiedenen polymeren Formen, von Monomeren bis Tetrameren, vorliegen; besonders bei hohen Konzentrationen neigt es zur Polymerisierung.

Zu den physiologischen Aktivitäten von Laktoferrin zählt die Regulierung der Eisenhomöostase, unspezifische Abwehr von verschiedenen bakteriellen Infektionen, antientzündliche Wirkung, Regulierung von Zellwachstum und -differenzierung sowie Schutz vor Krebserkrankungen und Metastasierung.

Bei Darmentzündungen wandern reife Neutrophile in die Darmschleimhaut ein und setzen Laktoferrin durch Degranulation frei, wodurch die Ausscheidung von Laktoferrin im Stuhl beträchtlich erhöht wird. Fäkales Laktoferrin ist daher ein Marker der neutrophilen Darmentzündung.

Indikationen

- Nachweis von entzündlichen Vorgängen im Darm
- Verlaufskontrolle bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)
- Vorhersage eines Rezidivs bei CED
- Beurteilung des Therapieerfolgs bei CED

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6870	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6870	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6870	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5x	1 x 100 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6870	CONJ	Konjugat (Kaninchen-anti-humanes-Laktoferrin)	1 x 200 µl
K 6870	STD	Standards, lyophilisiert	4 x 5 vials
K 6870	CTRL	Kontrollen	4 x 2 vials
K 6870	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6870	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6870	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Das **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 150 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Extraktionspuffer) ist bei **2–8°C drei Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **Standards** (STD) und **Kontrollen** (CTRL) sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** für die Standards und Kontrollen sind dem **Datenblatt** zu entnehmen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können nicht aufbewahrt werden.**
- Das **Konjugatkonzentrat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:100 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 9,9 ml Waschpuffer). Das Konzentrat ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Probenstabilität und -lagerung

Stuhlextrakt ist bei Raumtemperatur (15-30°C), bei 2-8°C sowie bei -20°C neun Tage haltbar. Die Extrakte sollten maximal drei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.

Stuhlprobenextraktion

Der verdünnte Extraktionspuffer *IDK Extract®* wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 1,5 ml Puffer:

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

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

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer *IDK Extract®* **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstecken in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- Das Röhrchen solange mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die

Pipettierschema

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

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrollen) im Protokollblatt markieren.
2.	Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.
3.	100 µl STD/CTRL/SAMPLE in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
4.	Streifen abdecken und 30 min bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
5.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6.	100 µl Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
7.	Streifen abdecken und 30 min bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
8.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
10.	10–20 min bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
11.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen

12.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.
-----	---

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Stuhlproben

Die ermittelte Stuhlprobenkonzentration wird mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzwertbereich zu etablieren.

Referenzwerte im Stuhl

1 g Stuhl entspricht 1 ml.

Normalwert: < 7,2 µg/ml

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

Probe	Laktoferrin [µg/ml]	VK [%]
1	6,6	4,4
2	28,7	3,4

Inter-Assay (n = 8)

Probe	Laktoferrin [µg/ml]	VK [%]
1	3,7	13,0
2	16,6	7,0

Spike-Wiederfindung

Zwei Proben wurden mit unterschiedlichen Laktoferrinkonzentrationen versetzt und gemessen (n = 2).

Probe	Ungespikte Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Laktoferrin erwartet [ng/ml]	Laktoferrin gemessen [ng/ml]
A	1,27	5,68	6,95	7,43
	1,27	28,41	29,68	29,70
	1,27	56,82	58,09	54,10
	1,27	113,64	114,90	98,37
B	17	5,68	22,18	20,88
	17	28,41	44,91	43,13
	17	56,82	73,36	63,25
	17	113,64	130,18	102,07

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

Probe	Verdünnung	Laktoferrin erwartet [µg/ml]	Laktoferrin gemessen [µg/ml]
A	1:800	29,7	29,7
	1:1600	14,9	16,7
	1:3200	7,4	9,3
	1:6400	3,7	5,1
	1:12800	1,9	2,3
B	1:1600	20,2	20,2
	1:3200	10,1	10,5
	1:6400	5,1	5,2
	1:12800	2,6	2,6

Analytische Sensitivität

Die Leerwert-Obergrenze (*limit of blank*, LoB) wurde gemäß der Richtlinie CLSI EP17-A2 bestimmt und ist 2,7 ng/ml.

Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die Laktoferrin-Reaktivität:

- Calprotectin < 1 %
- PMN-Elastase < 1 %
- Myeloperoxidase (MPO) < 3 %

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate

für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigegeführten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller

festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgeprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Levay, P. F. & Viljoen, M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 80, 252–67 (1995).
2. Gisbert, J. P., McNicholl, A. G. & Gomollon, F. Questions and answers on the role of fecal lactoferrin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 15, 1746–54 (2009).

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

Lactoferrin ELISA kit

For the in vitro determination of lactoferrin in stool

Valid from 2015-01-07

REF **K 6870**



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	19
<i>Sample stability and storage</i>	19
<i>Extraction of the stool samples</i>	19
<i>Dilution of samples</i>	21
7. ASSAY PROCEDURE	21
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Spiking recovery</i>	24
<i>Dilution recovery</i>	25
<i>Analytical Sensitivity</i>	25
<i>Specificity</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is an enzyme immunoassay intended for the determination of lactoferrin in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Lactoferrin is a 76 kDa iron-binding glycoprotein which is synthesized and stored in the secondary granules of neutrophils. It is also present in several secretory fluids, such as milk, saliva, tears, and nasal secretions.

Lactoferrin can exist in different polymeric forms ranging from monomers to tetramers; it tends to polymerize especially at high concentrations.

The physiological activities of lactoferrin include regulation of iron homeostasis, innate defense against a broad range of microbial infections, anti-inflammatory activity, regulation of cellular growth and differentiation and protection against cancer development and metastasis.

During intestinal inflammation, polymorphonuclear neutrophils infiltrate the mucosa and release lactoferrin by degranulation, which results in an increased excretion of lactoferrin into the feces. Fecal lactoferrin is therefore a marker for neutrophilic intestinal inflammation.

Indications

- Detection of intestinal inflammatory activity
- Monitoring of disease activity in inflammatory bowel disease (IBD)
- Prediction of relapse of IBD
- Assessment of IBD treatment response

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6870	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 wells
K 6870	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 6870	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract®</i> , 2,5x	1 x 100 ml
K 6870	CONJ	Conjugate (rabbit anti human lactoferrin)	1 x 200 µl

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6870	STD	Standards, lyophilised	4 x 5 vials
K 6870	CTRL	Controls	4 x 2 vials
K 6870	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 6870	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml
K 6870	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 50 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Precision pipettors calibrated and tips to deliver 10–1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.

- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8°C for one month**.
- The **extraction buffer concentrate** *IDK Extract*® must be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml EXBUF + 150 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must be redissolved at 37°C in a water bath. The **extraction buffer concentrate** *IDK Extract*® is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** (extraction buffer) can be stored in a closed flask at **2–8°C for three months**.
- The **lyophilized standards** (STD) and **controls** (CTRL) are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution details** are given in the **data sheet**. **Reconstituted standards and controls are not stable and cannot be stored**.
- The **conjugate** (CONJ) must be diluted **1:100 in wash buffer** (100 µl CONJ + 9,9 ml wash buffer). The undiluted conjugate is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8°C**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Sample stability and storage

Stool extract is stable at room temperature (15–30°C), at 2–8°C as well as at –20°C for nine days. Avoid more than three freeze-thaw cycles.

Extraction of the stool samples

Diluted extraction buffer *IDK Extract*® is used as a sample extraction buffer. We recommend the following sample preparation:

Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instruction for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the used amount of stool sample and the volume of the buffer.

SAS with 1.5 ml buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	1.5 ml
Dilution factor:	1:100

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty sample tube** with **1.5 ml** of ready-to-use *IDK Extract*[®] extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (orange part of cap) to open. Insert the orange dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution I: 1:100

Dilution of samples

The supernatant of the sample preparation procedure (dilution I) is diluted **1:10 in sample dilution buffer**. For example:

- **50 µl** supernatant (dilution I) + **450 µl** sample dilution buffer, mix well = **1:10 (dilution II)**. This results in a final dilution of 1:1000.

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution II** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is intended for the quantitative determination of lactoferrin in stool. In a first incubation step, the lactoferrin in the samples is bound to polyclonal antibodies, immobilized to the surface of the microtiter wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step, a peroxidase-labeled conjugate (rabbit anti human lactoferrin) is added which recognizes specifically the bound lactoferrin. After another washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, tetramethyl-benzidine (TMB), which reacts with the peroxidase. An acidic stop solution is added to stop the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of lactoferrin. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. Lactoferrin present in the patient samples is determined directly from this curve.

Test procedure

Before use, let **all reagents and samples** reach **room temperature** (15–30 °C), mix well.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to pipet the standards and controls in duplicate.

1.	Mark positions for STD/SAMPLE/CTRL (standard / sample / controls) in the protocol sheet.
2.	Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

3.	Add 100 µl of STD/CTRL/SAMPLE into the respective wells.
4.	Cover the strips and incubate for 30 min at room temperature (15–30°C).
5.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
6.	Add 100 µl conjugate in each well.
7.	Cover the strips and incubate for 30 min at room temperature (15–30°C).
8.	Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times with 250 µl of diluted wash buffer . After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
9.	Add 100 µl SUB (TMB substrate) in each well.
10.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature (15–30°C) in the dark.
11.	Add 100 µl STOP (ELISA stop solution) and mix well.
12.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the „4 parameter algorithm“.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Stool samples

Multiply the result by the dilution factor used to obtain the concentration of lactoferrin in the sample.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

LoB × sample dilution factor to be used

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

We recommend each laboratory to establish its own reference concentration range.

Reference values in stool

1 g stool is equivalent to 1 ml.

Normal value: <7,2 µg/ml

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

Sample	Lactoferrin [µg/ml]	CV [%]
1	6.6	4.4
2	28.7	3.4

Inter-Assay (n = 8)

Sample	Lactoferrin [µg/ml]	CV [%]
1	3.7	13.0
2	16.6	7.0

Spiking recovery

Two samples were spiked with different lactoferrin concentrations and measured using this assay.

Sample	Unspiked Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Lactoferrin expected [ng/ml]	Lactoferrin measured [ng/ml]
A	1.27	5.68	6.95	7.43
	1.27	28.41	29.68	29.70
	1.27	56.82	58.09	54.10
	1.27	113.64	114.90	98.37
B	17	5.68	22.18	20.88
	17	28.41	44.91	43.13
	17	56.82	73.36	63.25
	17	113.64	130.18	102.07

Dilution recovery

Two samples were diluted and analyzed. The results are shown below (n = 2):

Sample	Dilution	Lactoferrin expected [µg/ml]	Lactoferrin measured [µg/ml]
A	1:800	29.7	29.7
	1:1600	14.9	16.7
	1:3200	7.4	9.3
	1:6400	3.7	5.1
	1:12800	1.9	2.3
B	1:1600	20.2	20.2
	1:3200	10.1	10.5
	1:6400	5.1	5.2
	1:12800	2.6	2.6

Analytical Sensitivity

The LoB (limit of blank) was evaluated according to the guideline CLSI EP17-A2 and resulted in 2.7 ng/ml.

Specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to lactoferrin. The specificity is calculated in per cent, based on the cross-reactivity of these compounds with lactoferrin:

- Calprotectin < 1 %
- PMN elastase < 1 %
- Myeloperoxidase (MPO) < 3 %

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be

handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not to assemble wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch as wells from already opened microtiter plates are exposed to different conditions as sealed ones.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Quality control guidelines should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Levay, P. F. & Viljoen, M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 80, 252–67 (1995).
2. Gisbert, J. P., McNicholl, A. G. & Gomollon, F. Questions and answers on the role of fecal lactoferrin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 15, 1746–54 (2009).

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by