

# Laktoferrin ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von Laktoferrin in Stuhl*

# Lactoferrin ELISA

*For the in vitro determination of lactoferrin in stool*

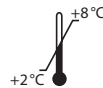
Gültig ab / Valid from 2022-02-22



**K 6870**



96



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>6. PROBENSTABILITÄT UND -LAGERUNG</b>	<b>5</b>
<i>Probenlagerung und -stabilität</i>	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	6
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>9</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>9</b>
<i>Referenzwerte</i>	9
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	11
<i>Linearität</i>	12
<i>Analytische Spezifität</i>	12
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>13</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>13</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>14</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>14</b>

## 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 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5x	1 x 100 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6870	CONJ	Konjugatkonzentrat (Ziege-anti-humanes- Laktoferrin)	1 x 200 µl
K 6870	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	4 x 5 vials
K 6870	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 6870	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	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\*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- 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 auf dem Etikett angegeben 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.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat *IDK Extract*<sup>®</sup>** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml *IDK Extract*<sup>®</sup> + 150 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das *IDK Extract*<sup>®</sup> kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*<sup>®</sup>) ist **4 Monate bei 2–8 °C** 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. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 7 Tage bei 2–8 °C oder -20 °C gelagert werden**.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENSTABILITÄT UND -LAGERUNG

### *Probenlagerung und -stabilität*

#### **Rohstuhl**

Rohstuhl ist 3 Tage bei Raumtemperatur (15–30°C), 4 Tage bei 2–8°C oder bis zu 6 Monaten bei -20°C stabil.

#### **Stuhlextrakt**

Stuhlextrakt ist 9 Tage bei Raumtemperatur (15–30°C), bei 2–8°C oder bei -20°C haltbar. Die Extrakte sollten maximal drei Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen werden.

### *Stuhlprobenextraktion*

Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) wird als **Probenextraktionspuffer** verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

#### **Stuhlprobenaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)**

##### ***Stuhlprobenröhrchen - Anwendung***

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

##### ***SAS mit 1,5 ml Probenextraktionspuffer:***

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 Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml Probenextraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) **befüllen**. **Wichtig:** Probenextraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch

den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.

- d) Das Röhrchen so lange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. **Wichtig:** 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 Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls im Probenextraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

## **Verdünnung I                      1:100**

### *Probenverdünnung*

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:10 mit Probenverdünnungspuffer** (SAMPLEBUF) weiterverdünnt. Zum Beispiel:

- **50 µl** Überstand (Verdünnung I) + **450 µl** Probenverdünnungspuffer, mischen = **1:10 (Verdünnung II)**. Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von 1:1 000.

Je **100 µl der Verdünnung II** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

## **7. TESTDURCHFÜHRUNG**

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Laktoferrin im Stuhl. In diesem ELISA wird Laktoferrin aus den Proben an auf Mikrotiterplatten fixierte polyklonale Antikörper gebunden. Während eines Waschschrilles werden ungebundene Komponenten entfernt. Gebundenes Laktoferrin wird mit Hilfe eines Peroxidase-markierten Antikörpers (Ziege-anti-humanes-Laktoferrin) spezifisch detektiert. Nach einem weiteren Waschschrill wird das Substrat TMB (Tetramethylbenzidin) auf die Mikrotiterplatte gegeben und durch die Peroxidase umgesetzt. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei

zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### *Pipettierschema*

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

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

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.	<b>100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben</b> in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und <b>30 min</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4.	<b>100 µl Konjugat</b> (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
5.	Streifen abdecken und <b>30 min</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
8.	<b>10–20 min*</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
9.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.



10.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> 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 ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 1 000** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) 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:

*LoQ* × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

LoQ siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 AG 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

### Genauigkeit – Präzision

#### Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 40

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ $\mu\text{g/ml}$ ]	VK [%]
1	28,75	4,1
2	6,56	4,8

#### Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 16

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ $\mu\text{g/ml}$ ]	VK [%]
1	17,66	9,5
2	4,45	14,0

### Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank*, LoB) 0,222 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD) 0,416 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation*, LoQ) 0,416 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20% VK.

### Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 6 Stuhlproben wurden dafür mit bekannten Laktoferrin-Konzentrationen versetzt und gemessen. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
1,27	5,7	6,94	7,43	107,03
	28,4	29,61	29,70	100,30
	56,8	58,06	54,10	93,17
	113,6	114,85	98,37	85,66
16,54	5,7	22,06	20,88	94,66
	28,4	44,12	43,13	97,76
	56,8	73,18	63,25	86,43
	113,6	129,81	105,10	80,96
123,88	5,7	128,32	124,44	96,97
	28,4	146,09	135,13	92,50
	56,8	179,44	155,68	86,76
	113,6	235,00	206,39	87,82
2,23	24,4	26,09	23,30	89,30
	32,6	34,05	33,63	98,75
	48,9	49,97	52,71	105,49
	65,1	67,36	76,21	113,12
5,36	24,4	28,44	24,78	87,13
	32,6	36,15	34,25	94,75
	48,9	51,53	51,94	100,78
	65,1	66,92	71,72	107,17
14,66	24,4	35,41	29,89	84,42
	32,6	42,35	39,88	94,16
	48,9	56,18	55,26	98,36
	65,1	70,02	75,26	107,48

### Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung von 2 Stuhlproben nachgewiesen.

Für Laktoferrin in Stuhl wurde in Bezug auf die Standardkurve ein lineares Verhalten im Bereich von 11,62 bis 151,46 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als  $\pm 20\%$ .

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:250	97,71	97,71	100,00
	1:375	65,14	78,20	120,06
	1:500	48,85	58,59	119,94
	1:750	32,57	35,65	109,45
	1:1 000	24,43	27,70	113,40
B	1:500	151,46	151,46	100,00
	1:1 000	75,73	83,36	110,07
	1:2 000	37,87	45,62	120,47
	1:2 500	30,29	33,85	111,73
	1:4 000	18,93	22,60	119,37
	1:8 000	9,47	11,62	122,77

### Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen mit struktureller Ähnlichkeit zu Laktoferrin. Es wurde keine Kreuzreaktivität gefunden.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration [ng/ml]	Gefundene Konzentration [ng/ml]	Fazit
PMN-Elastase	1 000	< 0,222	< LoB
Calprotectin	1 150	< 0,222	< LoB

## 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 gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

**Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

## 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 auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der 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 dem Kit beigelegten 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 Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene 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, zurückzusenden.

## 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).
3. Uchida et al. Immunochemical detection of human lactoferrin in feces as a new marker for inflammatory gastrointestinal disorders and colon cancer. *Clin. Biochem.* 27, 259-64 (1994)

**Verwendete Symbole:**

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend



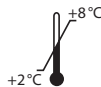


# Lactoferrin ELISA

*For the in vitro determination of lactoferrin in stool*

Valid from 2022-02-22

**REF** **K 6870**



**IVD**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>19</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>20</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>21</b>
<i>Sample stability and storage</i>	21
<i>Extraction of the stool samples</i>	22
<i>Dilution of samples</i>	23
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>23</b>
<i>Principle of the test</i>	23
<i>Test procedure</i>	23
<b>8. RESULTS</b>	<b>25</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>25</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>26</b>
<i>Reference range</i>	26
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>26</b>
<i>Accuracy – Precision</i>	26
<i>Accuracy – Trueness</i>	27
<i>Linearity</i>	28
<i>Analytical sensitivity</i>	28
<i>Analytical specificity</i>	28
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>29</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>29</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>30</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>30</b>

## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG 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 synthesised 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 polymerise 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 faeces. Faecal 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	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract®</i> , 2,5x	1 x 100 ml
K 6870	CONJ	Conjugate concentrate (goat anti human lactoferrin)	1 x 200 µl

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6870	STD	Standards, lyophilised (see specification for concentrations)	4 x 5 vials
K 6870	CTRL1	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 6870	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	4 x 1 vial
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	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

- Ultrapure water\*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Vortex mixer
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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 the assay more than once, ensure that reagents are stored at the 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.

- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37°C. The **WASHBUF** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 1 month**.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate IDK Extract®** has to be diluted with ultrapure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at 37°C in a water bath. The *IDK Extract®* is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract®*) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 4 months**.
- The **lyophilised 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 **specification data sheet**. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at 2–8°C or -20°C for 7 days**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in **wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **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) when stored at **2–8°C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Sample stability and storage*

#### **Raw stool**

Raw stool is stable for 3 days at room temperature (15–30°C), 4 days at 2–8°C or up to 6 months at -20°C.

#### **Stool extract**

Stool extract is stable for 9 days at room temperature (15–30°C), at 2–8°C or at -20°C. Avoid more than three freeze-thaw cycles.

### *Extraction of the stool samples*

**Extraction buffer** (1:2.5 diluted *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 – Instructions for use***

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

##### ***SAS with 1.5 ml sample extraction 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 stool sample tube** with **1.5 ml sample extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*®) before using it with the sample. **Important:** Allow the sample extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow 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) Vortex 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 sample extraction 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 1:1 000.

**100 µl of dilution II** per well are used in the test.

## **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, immobilised 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-labelled conjugate (goat anti human lactoferrin) is added which recognises 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 colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of lactoferrin. A dose response curve of the 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*

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

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.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

We recommend to pipet the standards and controls in duplicate.



1.	Add each <b>100 µl standards/controls/diluted samples</b> into the respective wells.
2.	Cover the strips and incubate for <b>30 min</b> at room temperature (15–30 °C).
3.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
4.	Add <b>100 µl conjugate</b> in each well.
5.	Cover the strips and incubate for <b>30 min</b> at room temperature (15–30 °C).
6.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add <b>100 µl substrate (SUB)</b> into each well.
8.	Incubate for <b>10–20 min*</b> at room temperature (15–30 °C) in the <b>dark</b> .
9.	Add <b>100 µl stop solution (STOP)</b> into each well and mix well.
10.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> against 620 nm as a reference.

\* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping 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

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 1 000** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) 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:

*LoQ × sample dilution factor to be used*

LoQ see chapter "Performance Characteristics".

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG 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

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 40**

The repeatability was assessed with 2 stool samples under **constant** parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [µg/ml]	CV [%]
1	28.75	4.1
2	6.56	4.8

#### **Reproducibility (Inter-Assay); n = 16**

The reproducibility was assessed with 2 stool samples under **varying** parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [µg/ml]	CV [%]
1	17.66	9.5
2	4.45	14.0

### Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, lactoferrin spikes with known concentrations were added to 6 different stool samples. The results below were obtained without consideration of the sample dilution factor.

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
1.27	5.7	6.94	7.43	107.03
	28.4	29.61	29.70	100.30
	56.8	58.06	54.10	93.17
	113.6	114.85	98.37	85.66
16.54	5.7	22.06	20.88	94.66
	28.4	44.12	43.13	97.76
	56.8	73.18	63.25	86.43
	113.6	129.81	105.10	80.96
123.88	5.7	128.32	124.44	96.97
	28.4	146.09	135.13	92.50
	56.8	179.44	155.68	86.76
	113.6	235.00	206.39	87.82
2.23	24.4	26.09	23.30	89.30
	32.6	34.05	33.63	98.75
	48.9	49.97	52.71	105.49
	65.1	67.36	76.21	113.12
5.36	24.4	28.44	24.78	87.13
	32.6	36.15	34.25	94.75
	48.9	51.53	51.94	100.78
	65.1	66.92	71.72	107.17
14.66	24.4	35.41	29.89	84.42
	32.6	42.35	39.88	94.16
	48.9	56.18	55.26	98.36
	65.1	70.02	75.26	107.48

### Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP6-A with a serial dilution of 2 different stool samples.

For lactoferrin in stool, the method has been demonstrated to be linear from 11.62 to 151.46 ng/ml based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
A	1:250	97.71	97.71	100.00
	1:375	65.14	78.20	120.06
	1:500	48.85	58.59	119.94
	1:750	32.57	35.65	109.45
	1:1 000	24.43	27.70	113.40
B	1:500	151.46	151.46	100.00
	1:1 000	75.73	83.36	110.07
	1:2 000	37.87	45.62	120.47
	1:2 500	30.29	33.85	111.73
	1:4 000	18.93	22.60	119.37
	1:8 000	9.47	11.62	122.77

### Analytical sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standards without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB	0.222 ng/ml
Limit of detection, LoD	0.416 ng/ml
Limit of quantitation, LoQ	0.416 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20% CV.

### Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to lactoferrin. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Concentration added [ng/ml]	Concentration obtained [ng/ml]	Conclusion
PMN elastase	1 000	< 0,222	< LoB
Calprotectin	1 150	< 0,222	< LoB

## 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 or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

**Warning:** Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still should 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 up 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 assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the 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 to 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.
- The guidelines for medical laboratories 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent 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).
3. Uchida et al. Immunochemical detection of human lactoferrin in feces as a new marker for inflammatory gastrointestinal disorders and colon cancer. *Clin. Biochem.* 27, 259-64 (1994)

**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
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant