
CERTEST Lactoferrin

ONE STEP human lactoferrin
CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.



For Information Purposes Only





CERTEST Lactoferrin

One step test to detect human lactoferrin in card format/
Prueba de un solo paso para detección de lactoferrina humana en formato cassette

ENGLISH

INTENDED USE

CerTest Lactoferrin one step card test is a coloured chromatographic immunoassay for the semi-quantitative detection of human lactoferrin (hLf) in stool samples that may reflect intestinal inflammation caused by several pathologies (inflammatory bowel disease, colorectal cancer and some enteropathies).

CerTest Lactoferrin card test offers a simple, a highly sensitivity and non-invasive screening assay to determine intestinal inflammatory activity, to monitor treatment response in these patients and to predict risk of relapse.

INTRODUCTION

Lactoferrin is a glycoprotein component of neutrophil secondary granules, a primary component of the acute inflammatory response and is released from fecal leukocytes. This protein is resistant to proteolysis in the faeces and may serve as a marker of inflammation in the intestine. The major cause of fecal neutrophils in patients with chronic diarrhoea is chronic inflammatory bowel disease of the colon (i.e., Crohn's Disease and ulcerative colitis). Lactoferrin has been also studied as a predictor of infection with invasive enteropathogens in children with diarrhoea. Bacterial inflammatory diarrhea may be caused by *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* and *Clostridium difficile*.

TEST PRINCIPLE

CerTest Lactoferrin is based on the principle of a semi-quantitative immunochromatographic assay for the determination of human lactoferrin in stool samples.

The strip consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against human lactoferrin and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-human lactoferrin) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to red polystyrene latex, forming coloured conjugate complexes.

If the sample is positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-human lactoferrin monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres), which was previously pre-dried on the absorbent pad. The mixture then moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the binding conjugate complexes migrate. The anti-human lactoferrin antibodies present on the membrane (test line) capture the coloured conjugate and the red line will be visible. This band is used to interpret the result.

If the sample is negative, there is no human lactoferrin presence and yet, the antigens may be present in a concentration lower than the cut-off value, for which the reaction will not take place with the red-coloured conjugate complex. The anti-human lactoferrin antibodies present on the membrane (test line) will not capture the antigen-red-coloured conjugate complex (not formed), for which the red test line will not appear.

Whether the sample is positive or not, the mixture continues to move across the membrane to the immobilized specific antibodies placed in the control line. The anti-specific protein antibodies present on the membrane will capture control red-conjugate complex and the control line will always appear. The presence of this red line serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable until the expiration date marked on its sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

PRECAUTIONS

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provide in the kit are approved for use in the CerTest Lactoferrin test. Do not use any other commercial kit component.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

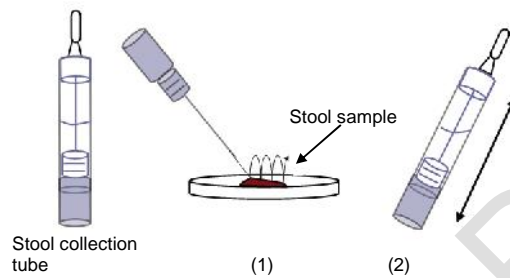


SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8°C) for 7 days prior to testing. For longer storage, maximum 6 months, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise stool sample as thoroughly as possible prior to preparation.

Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap of the stool collection tube and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (1), to collect faecal sample and add it to the stool collection tube. For liquid samples, add approx. 15µL in the stool collection tube using a micropipette.
2. Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (2). The stool collection vial with dilute sample can be stored for 7 days in the refrigerator (2-8°C) prior to testing.



MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest Lactoferrin card tests
- Instructions for use
- Stool collection tubes with diluent

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

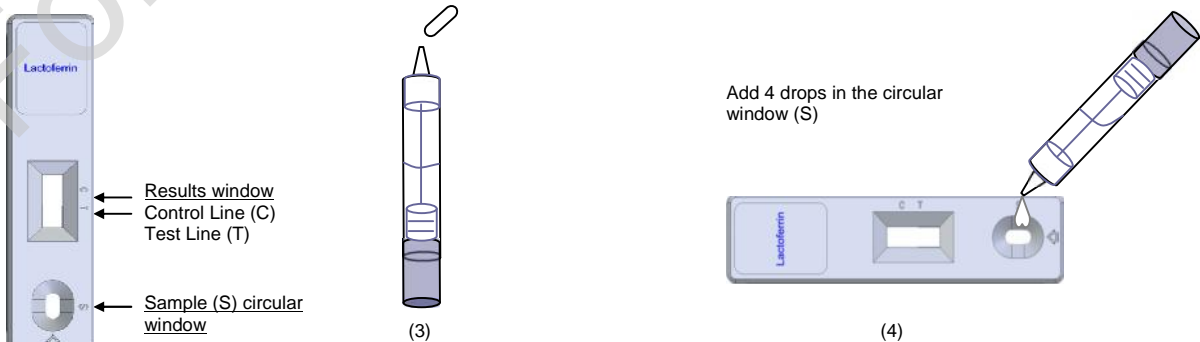
- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

TEST PROCEDURE

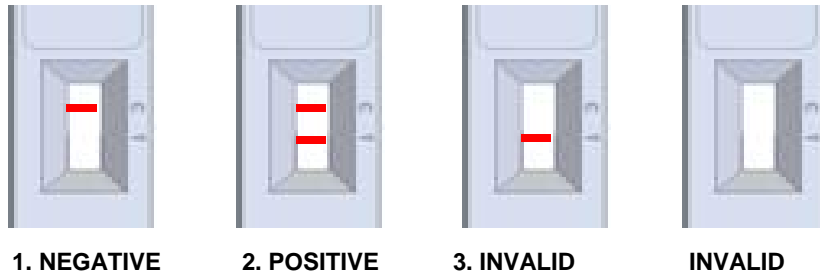
Allow tests, stool samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay.

1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove CerTest Lactoferrin card test from its sealed bag just before using it.
3. Take the stool collection tube, cut the end of the cap (3) and dispense 4 drops in the circular window marked with the letter S (4). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the result at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

If the test does not run due to solid particles, stir the sample added in the sample window (S) with the stick. If it doesn't work, dispense a drop of diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.



INTERPRETATION OF THE RESULTS (please refer to the illustration below)



	Lactoferrin (hLf)	Interpretation of the results
1.	- RED	There is no human lactoferrin presence which might mean neither active gastrointestinal inflammation.
2.	+ RED-RED	
3.	Any other result	Invalid result, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

NEGATIVE: Only a RED line appears across the results window in the site marked with the letter C (control line).

POSITIVE: In addition to the RED control line, a RED line also appears in the site marked with the letter T (test line) in the results window.

INVALID: Total absence of the control coloured line (RED) regardless the appearance or not of the test line (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the assay with a new test. If the symptoms or situation still persist, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured band in the test line (T) in the results window will vary depending on the concentration of human lactoferrin present in the specimen.

QUALITY CONTROL

Internal procedural control is included in the test. A red line appearing in the control line (C) in the results window is an internal control, which confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. An excess of stool sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the buffer and repeat the test.
3. The intensity of test line may vary from very strong at high human lactoferrin concentration to faint when the human lactoferrin concentration is close to the cut-off value of the test.
4. CerTest Lactoferrin should be used only with samples from human faeces. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper faecal specimens must be obtained.
5. Positive results determine the presence of human lactoferrin in faecal samples; nevertheless, it can be also due to several causes besides inflammatory bowel disease (IBD). A positive result should be followed up with additional diagnostic procedures. Endoscopy and histology on biopsy specimens are the methods for detecting and quantifying bowel inflammation.
6. A negative result is not meaningful because of it is possible the human lactoferrin concentration in the stool sample is lower than the cut-off value. Negative results do not exclude inflammation, some diseases such as celiac sprue and microscopic colitis polyps that involve mainly monocuclear inflammation.
7. Lactoferrin is a component of breast milk; the test will be positive in breast fed children and should not be used to evaluate neonates receiving breast milk.
8. Stool from patients with active inflammatory bowel diseases that usually involve significant neutrophilic inflammation of the intestine, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, would be positive for faecal lactoferrin. CerTest Lactoferrin could be sensitive for this diagnosis in patients with chronic diarrhea.



CERTEST Lactoferrin

One step test to detect human lactoferrin in card format/
Prueba de un solo paso para detección de lactoferrina humana en formato cassette

EXPECTED VALUES

Some studies established equal or higher 10µg hLf/g faeces as cut-off value to allow detect adult patients with gastrointestinal inflammatory pathology that will require to diagnosis additional diagnostic invasive procedures.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

Cut-off value of CerTest Lactoferrin is 100ng/mL (10µg hLf/g faeces) for human lactoferrin.

Clinical sensitivity and specificity

An evaluation, with faecal samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest Lactoferrin, CerTest) and another commercial immunoassay (IBD EZ VUE®, TechLab®). The results were as follows:

		IC test: IBD EZ VUE®		
		+	-	Total
IC test: CerTest Lactoferrin	+	20	0	20
	-	0	44	44
	Total	20	44	64

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest Lactoferrin vs IBD EZ VUE®	>99%	>99%	>99%	>99%

The results showed a high sensitivity and specificity to detect human lactoferrin using CerTest Lactoferrin.

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest Lactoferrin; no cross reactivity against other faecal markers occasionally present in faeces:

- Bovine and pig haemoglobin
- Bovine and pig transferrin
- Bovine lactoferrin
- Human calprotectin
- Human haemoglobin
- Human transferrin

For Information Purposes Only





CERTEST Lactoferrin

One step test to detect human lactoferrin in card format/
Prueba de un solo paso para detección de lactoferrina humana en formato cassette

ESPAÑOL

USO PREVISTO

CerTest Lactoferrin card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección semi-cuantitativa de lactoferrina humana (hLf) en muestras de heces como indicativo de inflamación gastrointestinal presente en diversas patologías (enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer colorectal y algunas enteropatías).

CerTest Lactoferrin card test ofrece un ensayo de cribado sencillo, de alta sensibilidad y no invasivo para determinar actividad inflamatoria intestinal, para el seguimiento de un tratamiento y para predecir el riesgo de recaídas.

INTRODUCCIÓN

La lactoferrina es un componente glicoproteico de los gránulos neutrófilos secundarios, componente primario de la respuesta aguda inflamatoria y es liberada a partir de los leucocitos fecales. Esta proteína es resistente a la proteólisis en las heces y puede servir como marcador de inflamación en el intestino. La causa más frecuente de la presencia de neutrófilos en heces en pacientes con diarrea crónica es la enfermedad crónica inflamatoria intestinal localizada en el colon (como la Enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa).

Se ha estudiado la lactoferrina como marcador de infección por enteropatógenos invasivos en niños con diarrea. La diarrea inflamatoria bacteriana puede ser causada por *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Clostridium difficile*.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest Lactoferrin es una prueba semi-cuantitativa inmunocromatográfica para la determinación de lactoferrina humana en muestras de heces.

La membrana de nitrocelulosa ha sido fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a lactoferrina humana en la línea de test (T), en la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a lactoferrina humana) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno rojo, formando dos complejos coloreados conjugados.

Si la muestra es positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-lactoferrina humana-microesferas rojas de látex) el cual ha sido secado previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-lactoferrina humana presentes en la membrana (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá. Esta línea se usará para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de lactoferrina humana o está presente en una concentración inferior al valor de cut-off y no se produce reacción con el complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-lactoferrina humana presentes en la membrana (línea de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerá la línea roja.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, la mezcla continuará moviéndose a través de la membrana hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en la línea de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en la membrana capturarán el complejo conjugado de control y la línea de control rojo siempre aparecerá. La aparición de esta línea se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30° C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES

- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con CerTest Lactoferrin test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.



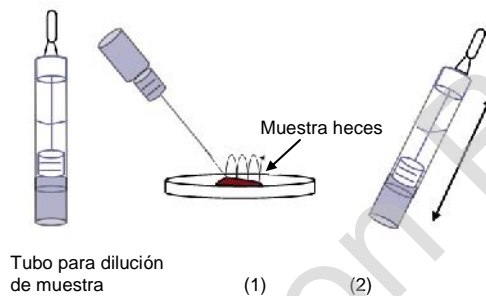
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras de heces deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se deben conservar en frío (2-8° C) máximo 7 días hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 6 meses, deben mantenerse congeladas a -20° C. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Preparación de la muestra (ver dibujo):

1. Abrir el tubo para dilución de muestra y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se introducirá el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (1), tomando una cantidad de heces y posteriormente se introducirá la muestra en el tubo para dilución de muestra. Para muestras líquidas, añada aprox. 15µL en el tubo para dilución de muestra utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitar para facilitar la dispersión de la muestra (2). Este tubo que contiene la muestra diluida puede conservarse en frío (2-8°C) durante 7 días antes de realizar la prueba.



MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest Lactoferrin card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para dilución de muestra con diluyente

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

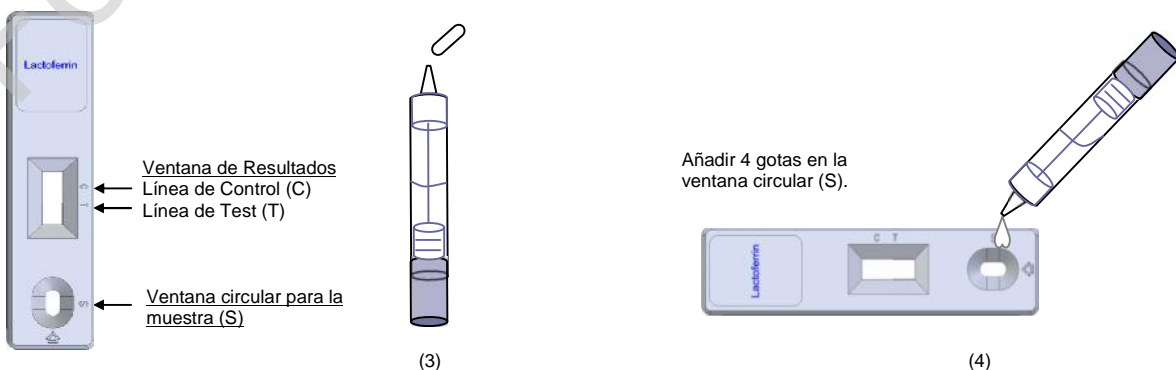
- Recipiente para la recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

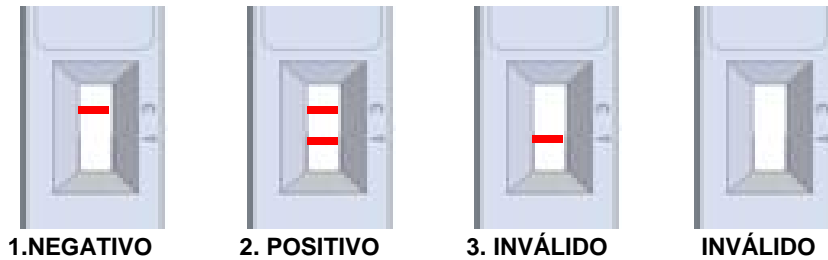
Previamente los tests, las muestras de heces y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30° C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el tubo para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest Lactoferrin de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el tubo para dilución de muestra, cortar la punta del tapón (3) y añadir 4 gotas en la ventana circular marcada con la letra S (4), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.

Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.



INTERPRETACION DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)



	Lactoferrina (hLf)	Interpretación de resultados
1.	- ROJO	No existe presencia de lactoferrina humana puede significar que no hay inflamación gastrointestinal activa.
2.	+ ROJO-ROJO	Existe presencia de lactoferrina humana en la muestra lo que puede indicar la presencia de una enfermedad inflamatoria intestinal.
3.	Cualquier otro resultado	Resultado inválido, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

NEGATIVO: Una sola línea de color ROJO aparece en la ventana de resultados del test, en la zona marcada con la letra C (línea de control).

POSITIVO: Además de la línea de control ROJA, también aparece una línea ROJA en la zona marcada con la letra T (línea de test) en la ventana de resultados.

INVÁLIDO: Cuando la línea de control (ROJA) no aparece, independientemente de que aparezca o no la línea de test (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: un volumen insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si los síntomas o la situación persisten, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.

OBSERVACIONES

La intensidad de la línea roja en la línea de test (T) en la ventana de resultados variará dependiendo de la concentración de lactoferrina humana presente en la muestra.

CONTROL DE CALIDAD

El control interno de funcionamiento viene incluido en la prueba. La línea roja que aparece en la zona de la línea de control (C) en la ventana de resultados es el control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

- Una vez abierto el envase, el test no debe usarse después de 2 horas.
- Un exceso de muestra de heces puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
- La intensidad de la línea de test puede variar desde muy fuerte a alta concentración de lactoferrina humana a débil cuando la concentración de lactoferrina humana está cerca del valor de cut-off del test.
- CerTest Lactoferrin debería utilizarse sólo con muestras de heces humanas. El uso de otras muestras no ha sido determinado. La calidad del test depende de la calidad de la muestra; por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras fecales.
- Los resultados positivos determinan la presencia de lactoferrina humana en muestras de heces; sin embargo, ésta puede ser debida a varias causas además de enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas. La endoscopia y la histología a partir de biopsia son los métodos más adecuados para detectar y cuantificar una inflamación en el intestino.
- Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de lactoferrina humana en la muestra de heces sea inferior al valor de cut-off. Los resultados negativos no excluyen de la presencia de inflamación, algunas enfermedades como la enfermedad celiaca y los pólipos microscópicos de colitis pueden presentar principalmente una inflamación mononuclear.



CERTEST Lactoferrin

One step test to detect human lactoferrin in card format/
Prueba de un solo paso para detección de lactoferrina humana en formato cassette

7.La lactoferrina es un componente de la leche materna, este test dará positivo en lactantes y no debería utilizarse para evaluar neonatos lactantes.

8.Las muestras de heces de pacientes que presenten la enfermedad inflamatoria intestinal que normalmente lleva asociada una inflamación neutrofílica del intestino, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, deberían dar resultados positivos para lactoferrina fecal. CerTest Lactoferrin puede ser sensible para el diagnóstico en pacientes con diarrea crónica.

VALORES ESPERADOS

En varios estudios se ha determinado que el valor de cut-off de lactoferrina humana sea igual o mayor que 10µg hLf/g en heces, para permitir detectar pacientes adultos con una patología inflamatoria gastrointestinal los cuales requerirán para su diagnóstico un procedimientos adicionales invasivos.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad analítica

El valor de cut-off de CerTest Lactoferrin es 100ng/mL (10µg hLf/g heces) para lactoferrina humana.

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces, comparando los resultados obtenidos con un test inmunocromatográfico (CerTest Lactoferrin, CerTest) y otro inmunoensayo comercializado (IBD EZ VUE®, TechLab®). Los resultados se muestran a continuación:

IC test: CerTest Lactoferrin	IC test: IBD EZ VUE®		
	+	-	Total
+	20	0	20
-	0	44	44
Total	20	44	64

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest Lactoferrin vs IBD EZ VUE®	>99%	>99%	>99%	>99%

Los resultados mostraron que CerTest Lactoferrin presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar lactoferrina humana.

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas de CerTest Lactoferrin; no se detectó reacción cruzada con otros marcadores fecales ocasionalmente presentes en las heces:

Calprotectina humana	Lactoferrina bovina
Hemoglobina bovina y de cerdo	Transferrina bovina y de cerdo
Hemoglobina humana	Transferrina humana



REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

1. Angriman I. et al. Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease. Clinica Chimica Acta 381 Feb 2007, p. 63-68
2. Guerrant R. et al. Measurement of Fecal Lactoferrin as a Marker of Fecal Leukocytes. Journal of Clinical Microbiology, Vol 30 No 5; May 1992, p. 1238-1242
3. Langhorst, M.D. et al. Noninvasive Markers in the Assessment of Intestinal Inflammation in Inflammatory Bowel Diseases: Performance of Fecal Lactoferrin, Calprotectin and PMN-Elastase, CRP, and Clinical Indices. Am. J. Gastroenterol. 2008; Vol 103, p. 162-169.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS/

SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	Keep dry Almacenar en lugar seco	Use by Fecha de caducidad	Manufacturer Fabricante	LOT	Batch code Número de lote	
Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura	Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL	Sample diluent Diluyente de muestra	REF	Catalogue number Número de referencia

For Information Purposes



For Information Purposes Only



For Information Only



For Information Only Purposes



CerTest
BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

