

Arbeitsanleitung/Manual

β -Defensin 2 ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung des β -Defensin 2 in Stuhl

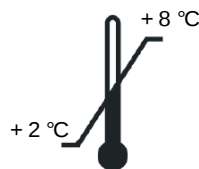
β -Defensin 2 ELISA Kit

For the in vitro determination of β -Defensin 2 in stool

Gültig ab / Valid from 05.07.2010



K 6500



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

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	2
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
8. PROBENVORBEREITUNG	5
STUHLPROBENEXTRAKTION	5
PROBENVERDÜNNUNG	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
HINWEISE	7
PIPETTIERSHEMA	8
10. ERGEBNISSE	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	10
12. QUALITÄTSKONTROLLE	10
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
13. TESTCHARAKTERISTIKA	11
SENSITIVITÄT	11
INTER- UND INTRAVARIATIONSKOEFFIZIENTE	11
WIEDERFINDUNG	11
LINEARITÄT	12
14. PUBLIKATIONEN MIT VERWENDUNG DES K 6500 ELISA KITS	12
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

TABLE OF CONTENT	PAGE
1. INTENDED USE	16
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	16
3. TEST PRINCIPLE	16
4. MATERIAL SUPPLIED	17
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
7. PRECAUTIONS	18
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	19
STOOL EXTRACTION	19
DILUTION OF SAMPLES	21
9. ASSAY PROCEDURE	21
PROCEDURAL NOTES	21
TEST PROCEDURE	22
10. RESULTS	23
11. LIMITATIONS	24
12. QUALITY CONTROL	24
EXPECTED VALUES	24
13. TEST CHARACTERISTICS	25
SENSITIVITY	25
INTER AND INTRA VARIATION COEFFICIENT	25
RECOVERY	25
SAMPLE DILUTION	26
14. PUBLICATIONS WITH THE USE OF THE K 6500 ELISA KIT	26
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay dient zur quantitativen Bestimmung von β -Defensin 2 in Stuhl. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die endogen gebildeten β -Defensine sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und tragen durch ihre antimikrobielle Wirkung (z.B. *Escherichia coli* oder *Helicobacter pylori* gegenüber) zur Barrierefunktion des Darmepithels bei.

Neun verschiedene Defensine epithelialen Ursprungs wurden beim Menschen bislang beschrieben, u.a. die humanen β -Defensine 1, -2, und -3 (HBD-1, -2, -3). Die Expression dieser β -Defensine wird durch proinflammatorische Zytokine und durch Mikroorganismen (z.B. *E. coli*, *H. pylori* oder *P. aeruginosa*) induziert.

Einen β -Defensin-Mangel beobachtet man z. B. in der Darmmukosa von Morbus-Crohn Patienten. Die dadurch eingeschränkte Barrierefunktion der Darmschleimhaut lässt eine vermehrte Invasion von Bakterien zu und führt damit möglicherweise zu den für M. Crohn typischen Entzündungen. Ob der β -Defensin-Mangel möglicherweise sogar bei der Entstehung des M. Crohn eine Rolle spielt, wird derzeit untersucht. Ob so genannte probiotische Bakterien die β -Defensin-Bildung anregen, ist ebenfalls Thema derzeitiger Untersuchungen.

Indikationen:

- Entzündliche Darmerkrankungen (IBD)
- Untersuchungen zur Integrität der Darmschleimhaut bei Morbus Crohn

3. TESTPRINZIP

In diesem Assay wird β -Defensin 2 aus den Standards bzw. den Proben an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen β -Defensin 2 erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines 2. polyklonalen Antikörpers, der biotinyliert ist. Dieser wird mit Peroxidase markiertem Streptavidin detektiert. Die gebundene Enzymmenge ist dem β -Defensin 2-Gehalt direkt proportional. Als Substrat für die Peroxidase wird TMB eingesetzt. Die gebildete, chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K 6500MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6500WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6500A2	AB	Detektionsantikörper (Ziege, anti β -Defensin 2-biotinyliert)	200 μ l
K 6500K	CONJ	Konjugat, (Streptavidin, Peroxidase-markiert)	200 μ l
K 6500ST	STD	Standards, lyophilisiert	4 x 5 vials x 500 μ l
K 6500SV	STDBUF	Standardverdünnungspuffer	20 ml
K 6500KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial x 500 μ l
K 6500KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	4 x 1 vial x 500 μ l
K 6500TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6500AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml
K 6500VP	ABBUF	Detektionsantikörperverdünnungspuffer	15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 μ l
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte 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 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), 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 WASHBUF (Pufferkonzentrat) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) werden mit **500 µl STDBUF** (Standardverdünnungspuffer) rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards und Kontrollen können nicht gelagert werden.
- Der **AB** (Detektionsantikörper, biotinyliert) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:100** in **ABBUF** (Detektionsantikörperverdünnungspuffer) verdünnt (z.B. 100 µl AB + 10 ml ABBUF). Unverdünnter AB ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). Verdünnter Antikörper kann **nicht** aufbewahrt werden.
- Das **CONJ** (Konjugat, POD-markierter Antikörper) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:100** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes CONJ 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.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. 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 verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlprobenextraktion

Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

1. Es wird ein Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 10 745804332) verwendet, das 100 mg dosiert. In dieses Stuhlaufarbeitungssystem wird die Stuhlprobe in **5 ml Waschpuffer** suspendiert.

Puffervolumen konstant - 5 ml

Verdünnungsfaktor konstant - 1:50

2. Alternativ kann eine Stuhlprobenmasse im Bereich von 80 - 120 mg manuell eingewogen werden. Bitte die exakte Menge für jede Probe notieren!
 - a. Jede einzelne Probe wird in 5 ml Puffer unabhängig von der eingewogenen Menge suspendiert.

Puffervolumen konstant - 5 ml

Der Verdünnungsfaktor ändert sich entsprechend der folgenden Tabelle und muss bei der Auswertung berücksichtigt werden:

Einwaage [mg]	Verdünnungs- faktor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
100	50

Einwaage [mg]	Verdünnungs- faktor
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

b. Die Puffermengen für die einzelnen Proben variieren in Abhängigkeit von den Stuhleinwaagen (siehe Tabelle). Dabei bleibt der Verdünnungsfaktor konstant.

Puffervolumen variabel

Verdünnungsfaktor konstant - 1:50

Somit kann der Verdünnungsfaktor für die Auswertung aller Proben einheitlich verwendet werden.

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
100	5.0

Einwaage [mg]	Puffervolumen [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
120	6.0

Anschließend wird die Stuhlsuspension mit dem Puffer gut gemischt (z. B. Vortexer für mindestens 30 sec. je nach Stuhlkonsistenz).

Danach wird ca. 1 ml von der Suspension in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert.

Die Stuhlsuspension ist nicht haltbar. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen.

Probenverdünnung

Stuhlproben

Der Überstand der Extraktion (**Verdünnung I**) wird **1:2** mit **Waschpuffer** verdünnt, z.B.

300 µl Überstand (Verdünnung I) + 300 µl Waschpuffer = 1:2 (**Verdünnung II**)

100 µl des Überstandes der Verdünnung II wird im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Die Stuhlsuspension ist nicht haltbar. Wir empfehlen für jeden Ansatz die Probe frisch einzuwiegen.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

Pipettierschema

Wir empfehlen Doppelbestimmungen durchzuführen.

1. Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch **5 x mit je 250 μ l** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
2. **100 μ l STD** (Standards), **CTRL** (Kontrollen) und **Proben** in Doppelbestimmungen in die Vertiefungen pipettieren.
3. **1 Std.** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
4. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 μ l** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5. **100 μ l** verdünnten **AB** (Detektionsantikörper, biotinyliert) pro Vertiefung pipettieren.
6. **1 Std.** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
7. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 μ l** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8. **100 μ l** verdünnte **CONJ** (Konjugatlösung, Streptavidin-POD) pro Vertiefung pipettieren.
9. **1 Std.** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
10. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250 μ l** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
11. **100 μ l SUB** (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
12. **15-20 Minuten** (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.
13. **50 μ l STOP** (Stopplösung) zusetzen und kurz mischen.
14. **Extinktion sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (oder 690 nm) messen.

10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Tests empfehlen wir:

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 von 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

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 empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration von 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

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 β -Defensin2 Konzentration der Stuhlprobe wird auf Grund der Probenvorbereitung wie im folgendem Beispiel berechnet:

Probenvorbereitung 1 und 2b: Verdünnungsfaktor konstant: 50

Die ermittelte β -Defensin2 Konzentration wird mit **100** multipliziert um die tatsächliche Konzentration im Stuhl zu bestimmen.

Probenvorbereitung 2a: Der Verdünnungsfaktor ist variabel

Der entsprechende Verdünnungsfaktor jeder Probe wird der Tabelle entnommen und mit 2 (Verdünnung II) multipliziert um die tatsächliche Konzentration im Stuhl zu bestimmen.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer β-Defensin 2-Konzentration größer dem größten Standard sollten verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Für die Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung unabhängiger externer Kontrollen.

Erwartete Ergebnisse

Referenzwert

(1g Stuhl entspricht 1ml)

Stuhl (n = 101):

35 ng/ml Stuhl

Anhand einer laborinternen Studie mit Stuhlproben von augenscheinlich Gesunden (n = 101) wurde ein Mittelwert von 35 ng/ml Stuhl ermittelt. Dieser Wert stimmt sehr gut überein mit den von Langhorst et al. (2007) publizierten Ergebnissen, die mit dem β-Defensin ELISA Kit von Immundiagnostik ermittelt wurden:

Stuhl (n = 23 gesunde Kontrollen):

31.0 ± 15.4 ng/g Stuhl*

*Langhorst J, Wieder A, Rueffer A, Michalsen A, Musial F, Dobos GJ. (2007) Activated innate immune system in irritable bowel syndrome? *Gut Online First*, published on April 11, 2007 as 10.1136/gut.2007.125005

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

13. TESTCHARAKTERISTIKA

*Sensitivität***

Nachweisgrenze 0.077 ng/ml.

*Inter- und Intravariationskoeffiziente***

Intervariationskoeffizient - 5.11 %

Intravariationskoeffizient - 5.26 %

**Soto E, Espinoza J, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Richani K, Santolaya-Forgas J, Romero R. (2007) Human beta-defensin-2: A natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* Jan; 20(1):15-22.

Wiederfindung

Zwei β -Defensin-2-haltige Proben wurden mit drei unterschiedlichen β -Defensin-2-Konzentrationen gespiked und gemessen.

Wiederfindung n=3

β Defensin 2 Probe [ng/ml]	β Defensin 2 Spike [ng/ml]	β Defensin 2 erwartet [ng/ml]	β Defensin 2 gemessen [ng/ml]
0.054	0.027	0.081	0.091
0.054	0.145	0.199	0.173
0.054	0.644	0.735	0.613
0.16	0.027	0.187	0.223
0.16	0.145	0.305	0.344
0.16	0.644	0.804	0.827

Linearität

n= 4

Vier Patientenproben wurden mit Waschpuffer verdünnt und gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle aufgelistet:

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	1:100	172.74	172.74
	1:200	86.37	84.68
	1:400	43.18	43.46
B	1:100	108.06	108.06
	1:200	54.03	52.64
	1:400	27.01	25.33
C	1:100	126.15	126.15
	1:200	63.08	82.61
	1:400	31.54	46.30
D	1:100	100.74	100.74
	1:200	50.37	53.68
	1:400	25.19	23.98

14. PUBLIKATIONEN MIT VERWENDUNG DES K 6500 ELISA KITS

1. Langhorst J, Wieder A, Rueffer A, Michalsen A, Musial F, Dobos GJ (2007) Activated innate immune system in irritable bowel syndrome? *Gut* Apr 11, 2007 [Epub ahead of print]
2. Soto E, Espinoza J, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Richani K, Santolaya-Forgas J, Romero R. (2007) Human beta-defensin-2: A natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* Jan; 20(1):15-22.

3. Langhorst J, Elsenbruch S, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ (2006) Higher Human Beta-Defensin 2 levels in feces in active Ulcerative Colitis and Ileal but not Colonic Crohn's disease compared to IBS. Suppl 2 to J Gastroenterol (4):Abstract A205, S1340, 107th Annual Meeting of AGA, May 20-25, 2006, Los Angeles
4. Kapel N, Benahmed N, Morali A, Svahn J, Canioni D, Goulet O, Ruemmele FM (2009) Fecal beta-Defensin-2 in Children With Inflammatory Bowel Diseases. *J Pediatric Gastroenterol and Nutr* 48:117–120.

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanserum verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/ Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. 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.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

β -Defensin 2 ELISA Kit

For the in vitro determination of β -Defensin 2 in stool

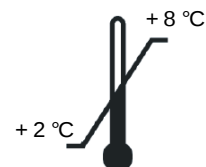
Valid from 05.07.2010



K 6500



96



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

1. INTENDED USE

This assay is intended for the quantitative determination of β -Defensin 2 in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The β -defensins are an integral part of the congenital immune system and contribute with their antimicrobial effect to the barrier function of intestinal epithelial cells.

Defensins exert a variable degree of antimicrobial activity against bacteria, fungi, and some enveloped viruses. Vertebrate defensins are classified as alpha- or beta-defensins, based on their pattern of disulfide bridges. Nine human defensins of epithelial origin have been found, three of them being β -defensins (HBD-1, -2 and -3). The expression of β -defensins is induced by the pro-inflammatory cytokines and also through microorganisms (e.g. *E. coli*, *H. pylori* or *P. aeruginosa*).

A β -defensin-2-deficiency can, for example, be observed in the intestinal mucous of patients with Crohn's disease. The defense system of the mucous membrane is therefore restricted and allows an increased invasion of bacteria, which could possibly lead to a typical infection in Crohn's disease patients.

Whether the β -defensin-2 deficiency could even play a role in the development of Crohn's disease is currently being researched. As is the possibility that it is the probiotic bacterium, which produces β -defensin.

Indications:

- Reduced β -defensin levels with Crohn's disease (HBD-2)
- Increased β -defensin levels with Colitis Ulcerosa (HBD-2)

3. TEST PRINCIPLE

The β -defensin 2 in standard and samples is bound to an available excess of polyclonal antibodies against β -defensin 2, which are immobilized on the surface of the microtiter plate. After a washing step, to remove all interfering substances, the quantification of bound β -defensin 2 is carried out by adding a polyclonal anti β -defensin 2 antibody, which is biotinylated. This antibody is detected with horseradish peroxidase labeled streptavidin. The amount of converted substrate by Peroxidase is directly proportional to the amount of bound β -defensin 2 and can be determined photometrically at 450 nm.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catal. No.	Content	Kit Components	Quantity
K 6500MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6500WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6500A2	AB	Detection antibody (Goat anti β -Defensin 2, biotinylated)	200 μ l
K 6500K	CONJ	Conjugate, (Streptavidin, HRP-conjugated)	200 μ l
K 6500ST	STD	Calibrator, lyophilized	4 x 5 vials x 500 μ l
K 6500SV	STDBUF	Standard dilution buffer	20 ml
K 6500KO1	CTRL	Control, lyophilized	4 x 1 vial x 500 μ l
K 6500KO2	CTRL	Control, lyophilized	4 x 1 vial x 500 μ l
K 6500TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6500AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml
K 6500VP	ABBUF	Detection antibody dilution buffer	15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 μ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

6. 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 assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 μ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidest.), 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. The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 μ l** of **STDBUF** (standard dilution buffer). Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted standards and controls are **not stable**.
- The **AB** (detection antibody, biotinylated) must be diluted **1:100** in **ABBUF** (detection antibody dilution buffer; e.g. 100 μ l AB + 10 ml ABBUF). The undiluted AB is stable at -20°C until the expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **CONJ** (conjugate, POD-antibody) must be diluted **1:100** in wash buffer (100 μ l CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted CONJ is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not 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**.
- 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**.

7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.

- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool Extraction

Please use the **washing buffer** as a sample extraction buffer.

1. We recommend the use of a stool sample preparation kit for dosing of 100 mg of stool sample (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; cat # 10 745804332). Add 5 ml buffer to the stool sample in the preparation kit.

Constant buffer volume: 5 ml

Constant dilution factor: 1 : 50

2. Alternatively, stool samples can be manually weighted within the range of 80 – 120 mg. Please note the exact sample amount!
 - a. Add **5 ml** buffer to the stool sample independent of the sample amount.

Constant buffer volume: 5 ml

Variable dilution factor

The dilution factor varies depending on the sample amount which must be considered in the subsequent calculations. Please see the list of the correction factors below:

Weight [mg]	Dilution factor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
100	50

Weight [mg]	Dilution factor
102	49.0
104	48.1
106	47.2
108	46.3
110	45.5
112	44.6
114	43.9
116	43.1
118	42.4
120	41.6

b. The buffer volume for the individual samples **varies** depending on the sample amount (see table).

Variable buffer volume

Constant dilution factor: 1 : 50

Therefore, the same dilution factor can be used for all samples in the subsequent evaluation of the results .

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
80	4.0
82	4.1
84	4.2
86	4.3
88	4.4
90	4.5
92	4.6
94	4.7
96	4.8
98	4.9
100	5.0

Weight [mg]	Buffer Volume [ml]
102	5.1
104	5.2
106	5.3
108	5.4
110	5.5
112	5.6
114	5.7
116	5.8
118	5.9
120	6.0

Afterwards, mix the weighed stool sample with the buffer and vortex for 30 sec. Transfer ca. 1 ml stool suspension in an Eppendorf-cup and centrifuge for 5 min at 13000 rpm.

The supernatant is not stable and can not be stored. We recommend to weight fresh sample amount for a new assay, if the analysis should be repeated.

Dilution of samples

Stool samples

Dilute the supernatant of the extraction (**dilution step I**) **1:2** with **wash buffer**, for example:

300 µl supernatant (dilution I) + 300 µl wash buffer = 1:2 (**dilution step II**)

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

The supernatant is not stable and can not be stored. We recommend to weight fresh sample amount for a new assay, if the analysis should be repeated.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1. Wash the precoated microtiter plate **5 x with 250 μ l** ELISA wash buffer.
2. Pipette **100 μ l** of **STD** (standards), **CTRL** (controls) or **samples** into each well.
3. Incubate for **1 hour** at room temperature, shaking on a horizontal mixer.
4. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250 μ l** of washing buffer solution.
5. Add **100 μ l** diluted **AB** (detection antibody solution).
6. Incubate for **1 hour** at room temperature, shaking on a horizontal mixer.
7. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250 μ l** of washing buffer solution.
8. Add **100 μ l** diluted **CONJ** (conjugate solution).
9. Incubate for **1 hour** at room temperature, shaking on a horizontal mixer.
10. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5x with 250 μ l** of washing buffer solution.
11. Add **100 μ l** of **SUB** (TMB-substrate) solution
12. Incubate approximately for **15-20 minutes** at room temperature, shaking slightly, until sufficient coloring is achieved.
13. Add **50 μ l** of **STOP** (stop solution) and mix shortly.
14. Determine **absorption immediately** with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm (or 690 nm) as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference.

10. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

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.

Faeces

To obtain the β -defensin 2 concentration in fecal samples multiply the estimated value by the dilution factor according to the sample preparation:

Sample preparation 1 and 2b: **Constant dilution factor : 50**

Multiply the obtained result by **100** to get the real concentration.

Sample preparation 2a: **Variable dilution factor**

The corresponding dilution factor is taken from the table and should be multiplied by 2 (dilution step II) to get the final concentration.

11. LIMITATIONS

Samples with β -defensin-2 levels greater than the highest calibrator, should be diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercial control samples for internal quality control.

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

Expected values

Reference range

(1 g stool is equivalent to 1 ml)

Stool (n = 101): **35 ng/ml**

Based on Immundiagnostik studies of evidently healthy persons (n = 101) a mean value of 35 ng/ml stool was estimated. This value is consistent with the results published by Langhorst et al. (2007) obtained using the β -Defensin ELISA Kit of Immundiagnostik.

Stool (n = 23 healthy controls): **31.0 $\pm$ 15.4 ng/g Stool***

*Langhorst J, Wieder A, Rueffer A, Michalsen A, Musial F, Dobos GJ. (2007) Activated innate immune system in irritable bowel syndrome? *Gut Online First*, published on April 11, 2007 as 10.1136/gut.2007.125005

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

13. TEST CHARACTERISTICS

*Sensitivity***

Detection limit 0.077 ng/ml.

*Inter and Intra variation coefficient***

Inter variation coefficient - 5.11 %

Intra variation coefficient - 5.26 %

**Soto E, Espinoza J, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Richani K, Santolaya-Forgas J, Romero R. (2007) Human beta-defensin-2: A natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* Jan; 20(1):15-22.

Recovery

Two samples were spiked with three different β -Defensin-2-concentrations and measured with the assay.

Recovery n=3

β Defensin 2 Sample [ng/ml]	β Defensin 2 Spike [ng/ml]	β Defensin 2 expected [ng/ml]	β Defensin 2 measured [ng/ml]
0.054	0.027	0.081	0.091
0.054	0.145	0.199	0.173
0.054	0.644	0.735	0.613
0.16	0.027	0.187	0.223
0.16	0.145	0.305	0.344
0.16	0.644	0.804	0.827

Sample dilution

Linearity n= 4

Four patient serum samples were diluted with wash buffer and analyzed. The results are shown below:

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
A	1:100	172.74	172.74
	1:200	86.37	84.68
	1:400	43.18	43.46
B	1:100	108.06	108.06
	1:200	54.03	52.64
	1:400	27.01	25.33
C	1:100	126.15	126.15
	1:200	63.08	82.61
	1:400	31.54	46.30
D	1:100	100.74	100.74
	1:200	50.37	53.68
	1:400	25.19	23.98

14. PUBLICATIONS WITH THE USE OF THE K 6500 ELISA KIT

1. Langhorst J, Wieder A, Rueffer A, Michalsen A, Musial F, Dobos GJ (2007) Activated innate immune system in irritable bowel syndrome? *Gut* Apr 11, 2007 [Epub ahead of print]
2. Soto E, Espinoza J, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Richani K, Santolaya-Forgas J, Romero R. (2007) Human beta-defensin-2: A natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* Jan; 20(1):15-22.

3. Langhorst J, Elsenbruch S, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ (2006) Higher Human Beta-Defensin 2 levels in feces in active Ulcerative Colitis and Ileal but not Colonic Crohn's disease compared to IBS. Suppl 2 to J Gastroenterol (4):Abstract A205, S1340, 107th Annual Meeting of AGA, May 20-25, 2006, Los Angeles
4. Kapel N, Benahmed N, Morali A, Svahn J, Canioni D, Goulet O, Ruemmele FM (2009) Fecal beta-Defensin-2 in Children With Inflammatory Bowel Diseases. *J Pediatric Gastroenterol and Nutr* 48:117–120.

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components which are made of human serum are tested for HVB and HIV and found to be negative. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. The normal precautions for laboratory working should be observed.
- Reagents of the test package contain sodium azide as a bactericide. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- All reagents in the test package are to be used for in-vitro diagnostics only.
- The reagents should not be used after the date of expiry (see label on the test package).
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components have been defined by the producer. Any alterations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number