

# EDN ELISA Kit

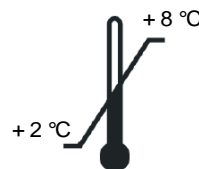
*Zur in vitro Bestimmung des EDN (Eosinophil-derived neurotoxin)  
in Serum, Plasma, Urin und Stuhl*

*For the in vitro Determination of EDN (Eosinophil-derived  
neurotoxin) in stool, urine, serum and plasma*

Gültig ab / valid from 03.01.2008



K 6811



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer  
Homepage  
Additional information about our products is available on our homepage

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

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von EDN (Eosinophil-derived neurotoxin, eosinophil protein x, EPX) aus Serum, Plasma, Urin und Stuhl geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

EDN (Eosinophil-derived neurotoxin, eosinophil protein x, EPX), ein kationisches Glykoprotein, das von aktivierten Eosinophilen freigesetzt wird, hat starke zytotoxische Eigenschaften und spielt bei der Erregerabwehr eine bedeutende Rolle. EDN wird aus Eosinophilen-Granula freigesetzt, die sich hauptsächlich in der Haut, der Lunge, dem Urogenital- und Gastrointestinaltrakt befinden, also in den Organen, die als Eintrittspforte für Erreger dienen. Die Anhäufung von EDN im Gastrointestinaltrakt ist mit einer Entzündung und einer Gewebeerstörung assoziiert.

Die Messung von EDN im Stuhl dient als objektiver Parameter einer aktuellen klinischen oder subklinischen chronischen Entzündung, die sich auf gastrointestinaler Ebene bemerkbar macht. Bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn ermöglicht die EDN-Messung die Evaluierung der Krankheitsaktivität und die Voraussage eines Rezidivs.

### Indikationen

- Morbus Crohn
- Differenzierung zwischen einer Nahrungsmittelallergie und einer Nahrungsmittelunverträglichkeit
- Beurteilung einer Eliminationsdiät
- Nachweis einer gestörten Integrität der Darmschleimhaut durch invasive Erkrankungen (z.B. CED, CC etc.)
- Nachweis intestinaler Parasitosen
- Parasitosen

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6811MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6811WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 6811EP	EXBUF	Extraktionspufferkonzentrat 2,5x	2 x 100 ml
K 6811AP	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	50 ml
K 6811ST	STD	Standard, lyophilisiert	2 x 5 vials
K 6811KO	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6811K	CONJ	Konjugat, polyklonaler peroxidase- markierter Antikörper,	150 µl
K 6811TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6811AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- 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)

## 5. 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.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C. Der **WASHBUF** 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.
- Der **EXBUF** (Extraktionspufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:2.5** mit aqua bidest. verdünnt werden (100 ml EXBUF + 150 ml aqua bidest.). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist in einem geschlossenen Gefäß **4 Monate** bei **2-8 °C** haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrolle) werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können vier Wochen** bei **2-8 °C** gelagert werden.
- Das **CONJ** (Konjugat) wird **1:100** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 9900 µl Waschpuffer). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENVORBEREITUNG

### *Stuhlprobenextraktion*

Der verdünnte Extraktionspuffer wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

1. Es wird ein Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/Mannheim (Best. Nr. 745 804)) verwendet, das 100 mg dosiert. In dieses Stuhlaufarbeitungssystem wird die Stuhlprobe in 5 ml Probenverdünnungspuffer suspendiert.

**Puffervolumen konstant: 5 ml**

**Verdünnungsfaktor konstant: 1:50**

2. Alternativ kann eine Stuhlprobe im Bereich von 80 - 120 mg eingewogen werden. Exakte Menge von jeder Probe notieren!
  - a. Jede einzelne Probe wird in 5 ml Probenverdünnungspuffer 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]	Verdünnungsfaktor
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
<b>100</b>	<b>50</b>

Einwaage [mg]	Verdünnungsfaktor
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
<b>100</b>	<b>5.0</b>

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 (**Verdünnung I**) in ein verschließbares Einweggefäß (z. B. von Eppendorf) überführt und für 5 Minuten bei 13000 rpm (= 13000 g) zentrifugiert.

## Probenverdünnung

### Stuhlproben

Der Überstand nach der Zentrifugation (Verdünnung I) wird **1:4 mit Waschpuffer** verdünnt. Zum Beispiel:

100 µl Überstand (Verdünnung I) + 300 µl Waschpuffer (**Verdünnung II**)

**Endverdünnung: 1 : 200**

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

3. Immundiagnostik bietet ein alternatives Probengewinnungs und –aufbereitungssystem für Messungen im Stuhl an (Artikel Nr. K 6998 SAS).

**Kurzbeschreibung zur Anwendung der Stuhlröhrchen:**

Unteres Röhrchengewinde aufschrauben, 2ml Extraktionspuffer in das Röhrchen pipettieren, zuschrauben.

Oberes Röhrchengewinde aufschrauben.

Unteren Teil des Stäbchens mit Einkerbungen in die Stuhlprobe stechen und ins Röhrchen zurückführen. Gut mischen.

Unteren Schraubverschluss aufschrauben, 0.5 - 1 ml Suspension abnehmen, in ein Eppendorf-Gefäß überführen und für 5 Minuten bei 13000 g zentrifugieren. Alternativ besteht die Möglichkeit die Proben in den Originalröhrchen zu zentrifugieren.

Den Überstand mit **Waschpuffer** aus dem Kit **1 : 2** weiter verdünnen, z.B.: 150 µl Überstand + 150 µl Waschpuffer (**Verdünnung II**)

**Endverdünnung: 1 : 200**

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

**Urinproben**

Wir empfehlen 24-Stunden Urin zu sammeln (die Ausscheidung von EDN im Urin wird in mg/Tag angegeben). Wenn dies nicht möglich ist, wird eine einzelne Urinprobe gesammelt. In diesem Fall muss gleichzeitig der Kreatiningehalt bestimmt werden und die Ausscheidung von EDN im Urin wird in µg/mmol Kreatinin angegeben.

Innerhalb von 30 min nach der Urinabgabe wird dieser zweimal für 10 min bei 1350 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Urin wird vor dem Einsatz im Test **1:200** in **ASYBUF** (Assaypuffer)verdünnt.

Zum Beispiel:

**10 µl Probe + 90 µl ASYBUF (Verdünnung I; 1:10)**

Danach wird die Verdünnung I weiter verdünnt.

**15 µl Verdünnung I + 285 µl ASYBUF (Verdünnung II; 1:20)**

**Endverdünnung: 1 : 200**

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

### Plasma/Serum Proben

Frisch abgenommenes Serum/Plasma sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Es kann entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test sollten die Proben gut gemischt werden. Wir empfehlen alle Proben in Doppelbestimmungen zu analysieren.

**Plasma/Serumproben** werden vor dem Einsatz im Test **1:20** in **ASYBUF** (Assaypuffer) verdünnt.

**20 µl** Probe + **380 µl** ASYBUF, gut mischen

**Endverdünnung: 1 : 20**

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

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper (monoklonal und polyklonal), die humanes EDN erkennen, verwendet.

Teststandards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die EDN enthalten, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen monoklonalen anti-human EDN Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das EDN aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (ein zweiter Peroxidase markierter polyklonaler Kaninchen anti-EDN Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper - humanes EDN – Peroxidase Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem EDN-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

### *Pipettierschema*

<p>Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen</p>
<p>Markieren Sie die Positionen für STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) im Protokollblatt</p>
<p>Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden</p>
<p>Waschen Sie die Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer). Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen</p>
<p>Pipettieren Sie 100 µl STD /SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen.</p>
<p>Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren</p>
<p>Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen</p>
<p>Pipettieren Sie 100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen</p>

<p>Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren</p>
<p>Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen</p>
<p>Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen</p>
<p>10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*</p>
<p>Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen, gut mischen</p>
<p>Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden</p>

\*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. 0.01).

### 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 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 EDN Konzentration der Stuhlprobe wird auf Grund der Proben-  
vorbereitung wie im folgendem Beispiel berechnet:

**Probenvorbereitung 1, 2b und 3: Verdünnungsfaktor konstant: 1:200**

Die ermittelte EDN Konzentration wird mit **200** multipliziert

**Probenvorbereitung 2a: Verdünnungsfaktor ist variabel**

Der entsprechende Verdünnungsfaktor jeder Probe wird der Tabelle entnommen und mit der ermittelten EDN Konzentration multipliziert.

## Urinproben

Um die EDN Konzentration im **Urin** zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit **200** multipliziert.

## Serum/Plasma Proben

Um die EDN Konzentration im **Serum/Plasma** zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit **20** multipliziert.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

**Stuhlproben** mit hohen EDN Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und nochmals bestimmt.

**Serum/Plasma** und **Urinproben** mit hohen EDN Konzentrationen werden mit Assaypuffer verdünnt und nochmals bestimmt.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

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

### *Erwartete Ergebnisse*

#### **Normwerte**

(1g Stuhl entspricht 1ml)

Stuhl (n= 53): 357,6 ng/ml

Anhand einer laborinternen Studie mit Stuhlproben von augenscheinlich Gesunden (n= 53) wurde ein Mittelwert von 357,64 ng/ml Stuhl ermittelt. Als obere Norm wird vorläufig ein Wert von 1700 ng/ml Stuhl angegeben.

Urin (n = 50): 81,8 (26,7 – 164,2) µg/mmol Kreatinin

Serum (n = 52): 26,4 (8,3 – 66,4) ng/ml

Plasma (n = 52): 18,1 (6,2 – 49,8) ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

Zwei Patientenproben wurden im EDN ELISA gemessen.

Intra-Assay (n=23)		
Probe	EDN [ng/ml]	VK [%]
1	303,58	6,99
2	760,50	5,71

Inter-Assay (n=14)		
Probe	EDN [ng/ml]	VK [%]
1	378,60	9,45
2	722,94	6,19

### *Wiederfindung*

Zwei Proben wurden mit 4 unterschiedlichen EDN Standardmengen versetzt und gemessen.

Wiederfindung n=2

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	EDN erwartet [ng/ml]	EDN gemessen [ng/ml]
0,672	1,50	2,172	2,181
0,672	2,50	3,172	2,962
0,672	4,00	4,672	4,551
0,672	2,00	2,672	2,546
1,294	2,00	3,294	3,674
1,294	0,50	1,794	1,994
1,294	3,50	4,794	5,284
1,294	1,50	2,794	3,156

### Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als  $B_0 + 3 \text{ SD}$  festgelegt. Gemessen wurde 21 mal der Standard null.

Probe	EDN Mittelwert [OD]	Standardabweichung (SD)	Nachweisgrenze [ng/ml]
1	0,103	0,010	0,164

### Linearität

Zwei Patientenproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]
A	1:200	798,10	798,10
	1:400	451,30	399,05
	1:800	231,10	199,53
	1:1600	109,40	99,76
B	1:200	281,20	281,20
	1:400	175,40	140,60
	1:800	85,10	70,30
	1:1600	32,30	35,15

## 12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. 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 benutzt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

## 13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller 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 zurück zu senden.

03.01.2008 10032005\_EDN.doc

### Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

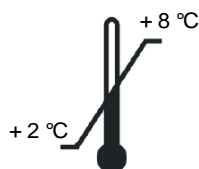
# EDN ELISA Kit

*For the in vitro Determination of EDN (Eosinophil-derived neurotoxin) in stool, urine, serum and plasma*

Valid from 03.01.2008



K 6811



## 1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of EDN (eosinophil-derived neurotoxin, eosinophil protein x, EPX) in serum, plasma, urine and stool. It is for *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

EDN (eosinophil-derived neurotoxin, eosinophil protein x, EPX), a cationic glycoprotein, which is released by activated eosinophiles, has strong cytotoxic characteristics and plays a significant role in the prevention of virus infections. It is released by the eosinophile granules in places where eosinophiles are mainly found: in the skin, lungs, urogenital and gastrointestinal tract, that is, in the organs acting as an entry point for pathogens. The accumulation of EDN in the intestine is associated with inflammation and tissue damage.

Measuring of EDN in stool can serve as an objective parameter for a current clinical or sub-clinical chronic inflammation located in the gastrointestinal area. In the case of Colitis ulcerosa and Crohn's disease, the EDN measurement enables the evaluation of a disease's activity and the prediction of a relapse.

### Indications

- Morbus Crohn
- Proof of a food allergy and incompatibility
- Assessment of an elimination diet
- Proof of damaged integrity of the intestinal mucous membrane caused by an invasive disease (e.g. CED, CC etc.)
- Proof of intestinal parasites
- Parasitoses

### 3 MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 6811MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6811WB	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 6811EP	EXBUF	Extraction buffer concentrate 2.5x	2 x 100 ml
K 6811AP	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	50 ml
K 6811ST	STD	Standard, lyophilized	2 x 5 vials
K 6811KO	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K6811K	CONJ	Conjugate, polyclonal peroxidase- labeled antibody	150 µl
K 6811TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6811AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

### 4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- 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 nm  
(reference wave length 620 or 690 nm)

## 5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, make sure that the reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- The **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml a. bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** could be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The **EXBUF** (extraction buffer) should be diluted with aqua bidest. **1:2.5** before use (100 ml EXBUF + 150 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution. The **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 four months.**
- The **lyophilized STD** (standards) and **CTRL** (control) are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. The **STD** (standards) and **CTRL** (control) must be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow the vial content to dissolve for **10 minutes** and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and control can be stored at 2-8°C for four weeks.**
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1:100** in wash buffer (100 µl CONJ + 9900 µl wash buffer). The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C.**

## 6. SAMPLE PREPARATION

### *Extraction step of the stool sample*

The **diluted extraction buffer** is used for sample extraction. We recommend the following sample preparation:

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 # 745804). 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**

**The dilution factor varies** depending on the sample amount which has to be considered in the subsequent calculations as shown 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
<b>100</b>	<b>50</b>

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). The dilution factor is constant.

#### 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
<b>100</b>	<b>5.0</b>

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 at least 30 sec. depending on the stool consistency.

Transfer approx. 1 ml stool suspension (**dilution step I**) in an Eppendorf-tube and centrifuge for 5 min at 13000 rpm (= 13000 g).

### *Dilution of samples*

#### Stool samples

After centrifugation, the supernatant of the extraction (dilution step I) is diluted **1:4** with **wash buffer**. For example:

100 µl supernatant (dilution I) + 300 µl wash buffer (**dilution II**)

**Final dilution: 1 : 200**

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

3. Immundiagnostik offers an alternative sample extraction and preparation system for measurements of stool samples (Catalogue Nr. K 6998 SAS).

**Short description of the use of the stool tubes:**

Unscrew the lower cap of the sample collection system, pipette 2ml of extraction buffer in the tube and screw tightly.

Unscrew the upper cap of the sample collection device.

Insert the tip of the notched collection stick into the faeces. Put the sample collection stick with the adhering faecal sample back into the sample collection device and screw tightly. Shake it very well.

Then, unscrew the lower cap of the sample collection device, transfer 0.5 - 1 ml of the suspension in an Eppendorf cup and centrifuge for 5 min at 13000 g. Alternatively, the samples can be centrifuged in the stool collection tubes.

Dilute the supernatant **1 : 2** with the **wash buffer** from the Kit, e.g.: 150 µl supernatant + 150 µl wash buffer (**dilution II**)

**Final dilution: 1 : 200**

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

**Urine samples**

We recommend to analyze urine collected within 24 hours, whereby the EDN concentration is expressed as mg/day. If 24 h-urine sample is not available, urine from a single time point can be analyzed. In this case, the urinary creatinine should also be quantified, and the EDN results are presented as µg/mmol creatinine.

Within 30 min of urine collection, the urine is separated by centrifugation, twice for 10 min at 1,350 x g and 4 °C. The supernatant is then transferred to a new plastic tube.

Prior to analyses, the urine samples should be diluted **1:200** with the **ASYBUF** (assay buffer).

For example:

**10 µl sample + 90 µl ASYBUF (dilution I; 1:10)**

**15 µl dilution I + 285 µl ASYBUF (dilution II; 1:20)**

**Final dilution: 1 : 200**

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

### Serum/plasma samples

Fresh collected Serum/Plasma should be centrifuged within one hour. Store samples at -20 °C if not assayed on the same day. Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicate analyses for each sample.

The **serum/plasma** samples should be diluted **1:20** with **ASYBUF** (assay buffer), prior to analyses.

**20 µl** sample + **380 µl** ASYBUF.

**Final dilution: 1 : 20**

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

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

The assay utilizes the two-site “sandwich” technique with two selected antibodies (monoclonal and polyclonal) that bind to human EDN.

Assay standards, controls and prediluted patient samples containing human EDN are added to wells of microplate that was coated with a high affine monoclonal anti-human EDN antibody. After the first incubation period, antibody immobilized on the wall of microtiter wells captures human EDN in the sample. Then a peroxidase-conjugated rabbit polyclonal anti-human EDN antibody is added to each microtiter well and a “sandwich” of capture antibody - human EDN – Peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a substrate for peroxidase. Finally an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of EDN. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. EDN present in the patient samples, is determined directly from this curve.

### *Test procedure*

<p>Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well</p>
<p>Mark the positions of STD /SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Control) on a protocol sheet</p>
<p>Take microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label</p>
<p>Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper</p>
<p>Add 100 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well.</p>
<p>Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer</p>
<p>Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper</p>
<p>Add 100 µl CONJ (conjugate) into each well</p>

Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer

Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper

Add 100 µl of SUB (substrate) into each well

Incubate for 10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark\*

Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly

Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference

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

## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use 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 has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

### 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 for the optical density a linear ordinate and for the concentration a logarithmic abscissa. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller 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.

## Stool samples

To obtain the EDN concentration in stool samples, determined value by the dilution factor according to the sample preparation:

**Sample preparation 1, 2b and 3: Dilution factor constant : 1 : 200**

Multiply the obtained result by **200** to get the final concentration.

**Sample preparation 2a: Dilution factor is variable**

The corresponding dilution factor is taken from the table and should be multiplied by the obtained result to get the final concentration.

## Urine samples

For the calculation of the EDN concentration in **urine** samples, the result has to be multiplied by **200**.

## Serum/plasma samples

For the calculation of the EDN concentration in **plasma/serum** the result has to be multiplied by **20**.

## 9. LIMITATIONS

**Stool samples** with EDN levels greater than the highest standard value, should be diluted with sample dilution buffer, and be re-assayed.

**Serum/plasma** and **urine** samples with EDN levels greater than the highest standard value, should be diluted with assay buffer, and be re-assayed.

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

Control samples should be analyzed 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.

### *Expected values*

#### **Normal ranges**

(1 g stool is equivalent to 1ml)

Stool (n= 53): 357,6 ng/ml

Based on Immundiagnostik studies of evidently healthy persons (n= 53) a mean value of 357,64 ng/ml stool was estimated. For the present, the value of 1700 ng/ml stool should be considered as the upper limit of the test.

Urine (n = 50): 81,8 (26,7 – 164,2) µg/mmol Creatinine

Serum (n = 52): 26,4 (8,3 – 66,4) ng/ml

Plasma (n = 52): 18,1 (6,2 – 49,8) ng/ml

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

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

Two patient samples measured using the assay.

Intra-Assay (n=23)		
Sample	EDN [ng/ml]	VK [%]
1	303,58	6,99
2	760,50	5,71

Inter-Assay (n=14)		
Sample	EDN [ng/ml]	VK [%]
1	378,60	9,45
2	722,94	6,19

### *Recovery*

Two samples were spiked with 4 different EDN standards and measured using this assay.

Recovery n=2

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	EDN expected [ng/ml]	EDN measured [ng/ml]
0,672	1,50	2,172	2,181
0,672	2,50	3,172	2,962
0,672	4,00	4,672	4,551
0,672	2,00	2,672	2,546
1,294	2,00	3,294	3,674
1,294	0,50	1,794	1,994
1,294	3,50	4,794	5,284
1,294	1,50	2,794	3,156

### *Sensitivity*

The sensitivity was set as  $B_0 + 3 \text{ SD}$ . The zero-standard was measured 21 times.

Sample	EDN mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [ng/ml]
1	0,103	0,010	0,164

### *Linearity*

Two patient samples were diluted and analyzed. The results are shown below:

n= 2

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Measured [ng/ml]
A	1:200	798,10	798,10
	1:400	451,30	399,05
	1:800	231,10	199,53
	1:1600	109,40	99,76
B	1:200	281,20	281,20
	1:400	175,40	140,60
	1:800	85,10	70,30
	1:1600	32,30	35,15

## 12. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was 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.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The 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 spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

## 13. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

## 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

1/3/2008 10032005\_EDN.DOC

### Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number