

# $\beta$ -Defensin 2 ELISA

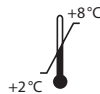
*Zur in-vitro-Bestimmung von  $\beta$ -Defensin 2 in Stuhl*

*For the in vitro determination of  $\beta$ -defensin 2 in stool*

Gültig ab / Valid from 2023-03-02

REF K 6500

$\Sigma$  96



IVD



REF K 6500.20

$\Sigma$  20 x 96



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

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

# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>5</b>
<i>Probenstabilität</i>	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	6
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>9</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>9</b>
<i>Referenzwerte</i>	9
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Linearität</i>	11
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	12
<i>Analytische Spezifität</i>	12
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>13</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>14</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>14</b>
<b>15. LITERATUR MIT VERWENDUNG DES K 6500 ELISA KITS</b>	<b>15</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

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

## 2. EINLEITUNG

Die endogen gebildeten  $\beta$ -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  $\beta$ -Defensine 1, -2, und -3 (HBD-1, -2, -3). Die Expression dieser  $\beta$ -Defensine wird durch proinflammatorische Zytokine und durch Mikroorganismen (z. B. *E. coli*, *H. pylori* oder *P. aeruginosa*) induziert.

Einen  $\beta$ -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  $\beta$ -Defensin-Mangel möglicherweise sogar bei der Entstehung des M. Crohn eine Rolle spielt, wird derzeit untersucht. Ob so genannte probiotische Bakterien die  $\beta$ -Defensin-Bildung anregen, ist ebenfalls Thema derzeitiger Untersuchungen.

### Indikationen

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

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge für Art.-Nr.	
			K 6500	K 6500.20
K 6500	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen	20 x 12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml	40 x 100 ml
K 6500	CONJ	Konjugatkonzentrat, (Ziegenanti- $\beta$ -Defensin-2, peroxidase markiert)	1 x 200 $\mu$ l	15 x 200 $\mu$ l

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge für Art.-Nr.	
			K 6500	K 6500.20
K 6500	STD	Standards, lyophilisiert	2 x 5 vials	25 x 5 vials
K 6500	STDBUF	Standardverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 20 ml	5 x 20 ml
K 6500	CTRL1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 vials	25 vials
K 6500	CTRL2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 vials	25 vials
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5x	2 x 100 ml	10 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml	20 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml	20 x 15 ml

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

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

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

## 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat *IDK Extract*<sup>®</sup>** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml *IDK Extract*<sup>®</sup> + 150 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das *IDK Extract*<sup>®</sup> kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*<sup>®</sup>) ist **4 Monate bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten Standards (STD) und Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. STD und CTRL werden mit **500 µl Standardverdünnungspuffer (STDBUF)** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Standards und Kontrollen** (rekonstituierte STD und CTRL) **können 2 Wochen bei 2–8 °C oder 4 Wochen bei -20 °C gelagert** und nach dem **Auftauen einmal** wieder verwendet werden.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.

- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### *Probenstabilität*

#### **Rohstuhl**

Rohstuhl ist 2 Tage bei Raumtemperatur (15–30 °C), 7 Tage bei 2–8 °C oder mindestens 4 Wochen bei -20 °C stabil.

#### **Stuhlextrakt**

Stuhlextrakt (1:100) ist drei Tage bei Raumtemperatur (15–30 °C), sieben Tage bei 2–8 °C oder sieben Tage bei -20 °C stabil. Die Extrakte sollten maximal 2 Einfrier-/Auf-tauzyklen unterzogen werden.

### *Stuhlprobenextraktion*

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

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

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

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

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

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

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

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!

- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- d) Das Röhrchen solange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. **Wichtig:** Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

## **Verdünnung I**                      **1:100**

### *Probenverdünnung*

Die Suspension aus der Probenvorbereitung (Verdünnung I) wird **1:2 mit Waschpuffer** weiterverdünnt. Zum Beispiel:

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

Dies entspricht nun einer Gesamtverdünnung von **1:200**.

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

## **7. TESTDURCHFÜHRUNG**

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von  $\beta$ -Defensin 2 in Stuhl. In diesem Assay wird  $\beta$ -Defensin 2 aus den Standards bzw. den Proben an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen  $\beta$ -Defensin 2 erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines zweiten polyklonalen Antikörpers, der peroxidase markiert ist. Die gebundene Enzymmenge ist dem  $\beta$ -Defensin-2-Gehalt direkt proportional. Nach einem Waschschrift zur Ent-

fernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin zugegeben. 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 proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### Pipettierschema

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

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

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

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

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	Je <b>100 µl Standards/Kontrollen/Proben</b> in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	<b>100 µl Konjugat</b> (verdünntes CONJ) in alle Vertiefungen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.



7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	<b>100 µl Substrat (SUB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	<b>10–20 min**</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
10.	<b>100 µl Stopplösung (STOP)</b> in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
11.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

\* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

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

## 8. ERGEBNISSE

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

### 1. 4-Parameter-Funktion

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

### 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

### 3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

## Stuhlproben

Der ermittelte  $\beta$ -Defensin-2-Spiegel der Stuhlproben wird mit dem **Verdünnungsfaktor 200** multipliziert.

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

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*höchste Konzentration der Standardkurve  $\times$  anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*LoB  $\times$  anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

### Referenzwerte

1 g Stuhl entspricht 1 ml.

**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 mit den publizierten Ergebnissen überein, die mit dem  $\beta$ -Defensin ELISA-Kit von Immundiagnostik AG ermittelt wurden:

Stuhl (n = 23 gesunde Kontrollen):  $31,0 \pm 15,4$  ng/g Stuhl<sup>[3]</sup>

Normbereich im Stuhl: 8 – 60 ng/ml Stuhl<sup>[1]</sup>

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Genauigkeit – Präzision

#### Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 30

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

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	17,70	4,2
2	81,44	3,0

#### Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 24

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 4 Stuhlproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	96,37	11,5
2	36,20	11,9
3	6,38	12,1
4	10,78	12,6

### Analytische Sensitivität

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

Leerwert (*limit of blank, LoB*) 0,0085 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection, LoD*) 0,0155 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation, LoQ*) 0,0232 ng/ml

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

### Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP6-A mittels einer seriellen Verdünnung von 3 Stuhlproben nachgewiesen.

Für  $\beta$ -Defensin 2 in Stuhl wurde ein lineares Verhalten im Bereich 0,065–2,200 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als  $\pm 20\%$ .

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:200	0,873	0,873	100,00
	1:400	0,436	0,483	110,64
	1:800	0,218	0,241	110,48
	1:1600	0,109	0,121	110,98
	1:3200	0,055	0,065	118,60
B	1:200	1,866	1,866	100,00
	1:400	0,933	1,094	117,24
	1:800	0,466	0,528	113,27
	1:1600	0,233	0,253	108,52
	1:3200	0,117	0,123	105,81
	1:6400	0,058	0,069	118,57
C	1:200	2,200	2,200	100,00
	1:400	1,100	1,129	102,60
	1:800	0,550	0,520	94,48
	1:1600	0,275	0,262	95,12
	1:3200	0,138	0,139	101,14

### Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 8 Stuhlproben wurden dafür mit bekannten  $\beta$ -Defensin-2-Konzentrationen versetzt und gemessen. In der folgenden Tabelle sind beispielhaft 4 Proben dargestellt:

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
0,03	0,76	0,79	0,75	95,30
	0,10	0,13	0,14	110,00
	0,57	0,60	0,63	106,05
0,019	0,76	0,78	0,78	100,39
	0,10	0,12	0,14	113,45
	0,57	0,58	0,62	106,68
0,041	0,08	0,12	0,13	110,38
	0,17	0,21	0,21	99,04
	0,41	0,45	0,43	95,41
	0,93	0,98	0,87	89,26
0,027	0,08	0,11	0,11	99,63
	0,17	0,20	0,22	111,79
	0,41	0,43	0,43	98,71
	0,93	0,96	0,97	100,54

### Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration [ng/ml]	Gefundene Konzentration [ng/ml]	Fazit
Lysozym	30	< 0,0085	< LoB
Calprotectin	52	< 0,0085	< LoB
PMN Elastase	10	< 0,0085	< LoB
Myeloperoxidase	100	< 0,0085	< LoB
EDN	16	< 0,0085	< LoB

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration [ng/ml]	Gefundene Konzentration [ng/ml]	Fazit
$\alpha$ 1-Antitrypsin	10	< 0,0085	< LoB
Sekretorisches IgA	600	< 0,0085	< LoB

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- 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 zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

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

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

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

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

### 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK Extract*<sup>®</sup> ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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, zurückzusenden.













## 15. LITERATUR MIT VERWENDUNG DES K 6500 ELISA KITS

1. Döll, M., Hauss, R. & Spermezan, R. Immunmodulierende Wirkung von (1-3),(1-6)-beta-D-Glucan -- gezeigt an der Neopterin- und b-Defensin-Synthese. *Naturheilpraxis* **05**, 676–681 (2005).
2. Soto, E. et al. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine* **20**, 15–22 (2007).
3. Langhorst, J. et al. Activated innate immune system in irritable bowel syndrome? *Gut* **56**, 1325–6 (2007).
4. Schwab, M. et al. The dietary histone deacetylase inhibitor sulforaphane induces human beta-defensin-2 in intestinal epithelial cells. *Immunology* **125**, 241–51 (2008).
5. Schwiertz, A., Huber, H. & Rusch, K. Human beta-defensin-2 levels in healthy individuals. *The American journal of gastroenterology* **104**, 2110; author reply 2110–1 (2009).
6. Langhorst, J. et al. Elevated human beta-defensin-2 levels indicate an activation of the innate immune system in patients with irritable bowel syndrome. *The American journal of gastroenterology* **104**, 404–10 (2009).
7. Kapel, N. et al. Fecal beta-defensin-2 in children with inflammatory bowel diseases. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **48**, 117–20 (2009).
8. Richter, M. et al. Influence of gestational age, cesarean section, and type of feeding on fecal human beta-defensin 2 and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **51**, 103–5 (2010).
9. Campeotto, F. et al. Fecal expression of human  $\beta$ -defensin-2 following birth. *Neonatology* **98**, 365–9 (2010).
10. Shirin, T. et al. Antimicrobial peptides in the duodenum at the acute and convalescent stages in patients with diarrhea due to *Vibrio cholerae* O1 or enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **13**, 1111–20 (2011).
11. Kabeerdoss, J. et al. Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12® on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition journal* **10**, 138 (2011).
12. Savilahti, E. M. et al. Intestinal defensin secretion in infancy is associated with the emergence of sensitization and atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy* **42**, 405–11 (2012).



13. Lahtinen, S. J. et al. Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM® modifies subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly. *Age* **34**, 133–43 (2012).
14. Kalach, N. et al. Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow's milk allergy in toddlers. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **51**, 351–61 (2013).

### Verwendete Symbole:

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

# $\beta$ -Defensin 2 ELISA

*For the in vitro determination of  $\beta$ -Defensin 2 in stool*

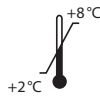
Valid from 2023-03-02

REF K 6500

REF K 6500.20

$\Sigma$  96

$\Sigma$  20 x 96



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

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

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>19</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>20</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>21</b>
<i>Sample stability</i>	21
<i>Extraction of the stool samples</i>	22
<i>Dilution of samples</i>	23
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>23</b>
<i>Principle of the test</i>	23
<i>Test procedure</i>	23
<b>8. RESULTS</b>	<b>25</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>25</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>26</b>
<i>Reference range</i>	26
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>26</b>
<i>Accuracy – Precision</i>	26
<i>Accuracy – Trueness</i>	27
<i>Linearity</i>	28
<i>Analytical sensitivity</i>	28
<i>Analytical specificity</i>	29
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>29</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>30</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>30</b>
<b>15. PUBLICATIONS USING K 6500 ELISA KIT</b>	<b>31</b>

## 1. INTENDED USE

This assay is intended for the quantitative determination of  $\beta$ -defensin 2 in stool. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

The  $\beta$ -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  $\beta$ -defensins (HBD-1, -2 and -3). The expression of  $\beta$ -defensins is induced by the pro-inflammatory cytokines and also through microorganisms (e.g. *E. coli*, *H. pylori* or *P. aeruginosa*).

A  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -defensin.

### Indications

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

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity for cat. no.	
			K 6500	K 6500.20
K 6500	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells	20 x 12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml	40 x 100 ml
K 6500	CONJ	Conjugate concentrate, (goat anti- $\beta$ -defensin 2, HRP-conjugated)	1 x 200 $\mu$ l	15 x 200 $\mu$ l
K 6500	STD	Standards, lyophilised	2 x 5 vials	25 x 5 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity for cat. no.	
			K 6500	K 6500.20
K 6500	STDBUF	Standard dilution buffer, ready-to-use	1 x 20 ml	5 x 20 ml
K 6500	CTRL1	Control, lyophilised, (see specification for range)	2 x 1 vial	25 vials
K 6500	CTRL2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial	25 vials
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract® 2.5x</i>	2 x 100 ml	10 x 100 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml	20 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml	20 x 15 ml

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

#### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

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

#### 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

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

- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37°C. The **WASHBUF** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 1 month**.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate IDK Extract®** has to be diluted with ultrapure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at 37°C in a water bath. The *IDK Extract®* is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Extraction buffer (1:2.5 diluted *IDK Extract®*) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 4 months**.
- The **lyophilised standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the STD and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of standard dilution buffer (STDBUF)** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Standards and controls** (reconstituted STD and CTRL) **can be stored at 2–8°C for 2 weeks or at -20°C for 4 weeks** and can be used **once after thawing**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in **wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8°C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Sample stability*

#### **Raw stool**

Raw stool is stable for 2 days at room temperature (15–30°C), 7 days at 2–8°C or at least 4 weeks at -20°C.

## Stool extract

**Stool extract (1:100)** is stable for 3 days at room temperature (15–30°C), 7 days at 2–8°C or 7 days at -20°C. Avoid more than 2 freeze-thaw cycles.

### *Extraction of the stool samples*

**Extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*®) is used as a **sample extraction buffer**. We recommend the following sample preparation:

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

#### ***Stool sample tube – Instructions for use***

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

#### ***SAS with 1.5 ml extraction buffer:***

Applied amount of stool: 15 mg

Buffer Volume: 1.5 ml

Dilution Factor: 1:100

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

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty sample tube** with **1.5 ml extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*®) before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Vortex the tube well until no stool sample remains in the notches. **Important:** Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.

- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

**Dilution I: 1:100**

### *Dilution of samples*

The supernatant of the sample preparation procedure (dilution I) is diluted **1:2 in wash buffer**. For example:

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

This results in a final dilution of **1:200**.

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

## **7. ASSAY PROCEDURE**

### *Principle of the test*

This ELISA is designed for the quantitative determination of  $\beta$ -defensin 2 in stool. The  $\beta$ -defensin 2 in standards and samples is bound to an available excess of polyclonal antibodies against  $\beta$ -defensin 2, which are immobilised on the surface of the microtiter plate. After a washing step, to remove all interfering substances, the quantification of bound  $\beta$ -defensin 2 is carried out by adding a polyclonal anti  $\beta$ -defensin 2 antibody, which is horseradish peroxidase labelled. After a washing step to remove the unbound components, the peroxidase substrate tetramethylbenzidine is added. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The colour changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour proportional to the  $\beta$ -defensin 2 concentration in the sample. 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.  $\beta$ -defensin 2, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

### *Test procedure*

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

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

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

We recommend to carry out the tests in duplicate.



1.	Wash the precoated microtiter plate <b>5 x with 250 µl ELISA wash buffer</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
2.	Add each <b>100 µl standards/samples/controls</b> into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C), <b>shaking* on a horizontal mixer</b> .
4.	Discard the contents of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
5.	Add <b>100 µl conjugate</b> (diluted CONJ) in each well.
6.	Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C), <b>shaking* on a horizontal mixer</b> .
7.	Discard the contents of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) in each well.
9.	Incubate for <b>10–20 minutes**</b> at room temperature (15–30 °C) <b>in the dark</b> .
10.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) and mix well.
11.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> against 620 nm as a reference.

\* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

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

## 8. RESULTS

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

### 1. 4 parameter algorithm

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

### 2. Point-to-point calculation

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

### 3. Spline algorithm

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

## Stool

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 200** to get the actual concentrations.

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

## 9. LIMITATIONS

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

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

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

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

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

*LoB × sample dilution factor to be used*

LoB see chapter "Performance Characteristics".

## 10. QUALITY CONTROL

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

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

### *Reference range*

1 g stool is equivalent to 1 ml.

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

Based on Immundiagnostik AG 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 using the  $\beta$ -Defensin ELISA Kit of Immundiagnostik AG.

Stool (n = 23 healthy controls): 31.0  $\pm$  15.4 ng/g stool<sup>[3]</sup>

Reference range in stool samples: 8–60 ng/ml stool<sup>[1]</sup>

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 30**

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

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	17.70	4.2
2	81.44	3.0

### Reproducibility (Inter-Assay); n = 24

The reproducibility was assessed with 4 stool samples under **varying** parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	96.37	11.5
2	36.20	11.9
3	6.38	12.1
4	10.78	12.6

### Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore,  $\beta$ -defensin 2 spikes with known concentrations were added to 8 different stool-samples. In the table below, 4 exemplary samples are shown:

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
0.03	0.76	0.79	0.75	95.30
	0.10	0.13	0.14	110.00
	0.57	0.60	0.63	106.05
0.019	0.76	0.78	0.78	100.39
	0.10	0.12	0.14	113.45
	0.57	0.58	0.62	106.68
0.041	0.08	0.12	0.13	110.38
	0.17	0.21	0.21	99.04
	0.41	0.45	0.43	95.41
	0.93	0.98	0.87	89.26
0.027	0.08	0.11	0.11	99.63
	0.17	0.20	0.22	111.79
	0.41	0.43	0.43	98.71
	0.93	0.96	0.97	100.54

### Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline EP06-A with a serial dilution of 3 different stool samples.

For  $\beta$ -defensin 2 in stool, the method has been demonstrated to be linear from 0.065 to 2.200 ng/ml, showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
A	1:200	0.873	0.873	100.00
	1:400	0.436	0.483	110.64
	1:800	0.218	0.241	110.48
	1:1600	0.109	0.121	110.98
	1:3200	0.055	0.065	118.60
B	1:200	1.866	1.866	100.00
	1:400	0.933	1.094	117.24
	1:800	0.466	0.528	113.27
	1:1600	0.233	0.253	108.52
	1:3200	0.117	0.123	105.81
	1:6400	0.058	0.069	118.57
C	1:200	2.200	2.200	100.00
	1:400	1.100	1.129	102.60
	1:800	0.550	0.520	94.48
	1:1600	0.275	0.262	95.12
	1:3200	0.138	0.139	101.14

### Analytical sensitivity

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

Limit of blank, LoB	0.0085 ng/ml
Limit of detection, LoD	0.0155 ng/ml
Limit of quantitation, LoQ	0.0232 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

### Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to  $\beta$ -defensin 2. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Concentration added	Concentration obtained [ng/ml]	Conclusion
Lysozyme	30	< 0.0085	< LoB
Calprotectin	52	< 0.0085	< LoB
PMN elastase	10	< 0.0085	< LoB
Myeloperoxidase	100	< 0.0085	< LoB
EDN	16	< 0.0085	< LoB
$\alpha$ 1-antitrypsin	10	< 0.0085	< LoB
Secretory IgA	600	< 0.0085	< LoB

## 12. PRECAUTIONS

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

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

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still should be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any

spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

### 13. TECHNICAL HINTS

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

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

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













## 15. PUBLICATIONS USING K 6500 ELISA KIT

1. Döll, M., Hauss, R. & Spermezan, R. Immunmodulierende Wirkung von (1-3),(1-6)-beta-D-Glucan -- gezeigt an der Neopterin- und b-Defensin-Synthese. *Naturheilpraxis* **05**, 676–681 (2005).
2. Soto, E. et al. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine* **20**, 15–22 (2007).
3. Langhorst, J. et al. Activated innate immune system in irritable bowel syndrome? *Gut* **56**, 1325–6 (2007).
4. Schwab, M. et al. The dietary histone deacetylase inhibitor sulforaphane induces human beta-defensin-2 in intestinal epithelial cells. *Immunology* **125**, 241–51 (2008).
5. Schwiertz, A., Huber, H. & Rusch, K. Human beta-defensin-2 levels in healthy individuals. *The American journal of gastroenterology* **104**, 2110; author reply 2110–1 (2009).
6. Langhorst, J. et al. Elevated human beta-defensin-2 levels indicate an activation of the innate immune system in patients with irritable bowel syndrome. *The American journal of gastroenterology* **104**, 404–10 (2009).
7. Kapel, N. et al. Fecal beta-defensin-2 in children with inflammatory bowel diseases. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **48**, 117–20 (2009).
8. Richter, M. et al. Influence of gestational age, cesarean section, and type of feeding on fecal human beta-defensin 2 and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **51**, 103–5 (2010).
9. Campeotto, F. et al. Fecal expression of human  $\beta$ -defensin-2 following birth. *Neonatology* **98**, 365–9 (2010).
10. Shirin, T. et al. Antimicrobial peptides in the duodenum at the acute and convalescent stages in patients with diarrhea due to *Vibrio cholerae* O1 or enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **13**, 1111–20 (2011).
11. Kabeerdoss, J. et al. Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12® on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition journal* **10**, 138 (2011).
12. Savilahti, E. M. et al. Intestinal defensin secretion in infancy is associated with the emergence of sensitization and atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy* **42**, 405–11 (2012).



13. Lahtinen, S. J. et al. Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM® modifies subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly. *Age* **34**, 133–43 (2012).
14. Kalach, N. et al. Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow's milk allergy in toddlers. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **51**, 351–61 (2013).

**Used symbols:**

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant