

IDK[®] EDN ELISA

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 2022-02-22

REF K 6821

Σ
96

$\pm 8^{\circ}\text{C}$
 $\pm 2^{\circ}\text{C}$

IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von EDN (*eosinophil-derived neurotoxin*, auch bekannt als RNASE2 oder *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 (z.B. durch chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Darmkrebs)
- Nachweis intestinaler Parasiten / Parasitosen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6821	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10 x	2 x 100 ml
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract</i> ®, 2,5 x	2 x 100 ml
K 6821	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 6821	CAL	Kalibrator, lyophilisiert	2 x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6821	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6821	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6821	CONJ	Konjugatkonzentrat, polyklonaler peroxidase-markierter Antikörper	1 x 200 µl
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 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 10–1 000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3 000 g
- 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 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.

- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird unmittelbar 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.**
- **Vorbereitung des Extraktionspuffers:** Das **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®** muss vor Gebrauch **1:2,5** in **Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml *IDK Extract®* + 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®* kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Extraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract®*) ist **4 Monate bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Der lyophilisierte Kalibrator (CAL) und die lyophilisierten Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. CAL und CTRL werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert und kurz geschwenkt, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Sie werden zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Kalibrator und Kontrollen** (rekonstituierte CAL und CTRL) **können 4 Wochen bei 2–8 °C gelagert werden.**
- Als **Leerwert** (Blank) werden **100 µl Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) pipettiert.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Lagerung

Rohstuhl kann 72 Stunden bei Raumtemperatur (15–30°C) und 4°C oder für 8 Wochen bei -20°C gelagert werden.

Stuhlextrakt (1:100) kann bei Raumtemperatur (15–30°C) für einen Tag, bei 2–8°C für 5 Tage oder bei -20°C für 7 Tage gelagert werden. Der Extrakt sollte maximal zwei Einfrier-/ Auftauzyklen unterzogen werden.

Stuhlprobenextraktion

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

Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

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

SAS mit 1,5 ml Probenextraktionspuffer:

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

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

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml Probenextraktionspuffer** (1:2,5 verdünntes *IDK Extract*®) **befüllen**. Wichtig: Probenextraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstecken 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 mischen 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 Probenextraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (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

Stuhlproben

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

100 µl Verdünnung I + **300 µl** Waschpuffer = **Verdünnung II (1:4)**

Dies entspricht nun einer **Gesamtverdünnung** von **1:400***.

*Bei Probenkollektiven mit erwarteten erhöhten Werten wird eine Verdünnung von 1:1000 empfohlen.

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 und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Urin wird vor dem Einsatz im Test **1:400 in Assaypuffer** (ASYBUF) verdünnt.

Zum Beispiel:

10 µl Probe + **190 µl** ASYBUF = **Verdünnung I** (1:20)

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

Dies entspricht nun einer **Gesamtverdünnung** von **1:400**.

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

Plasma-/ Serumproben

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 **1:40 in Assaypuffer** (ASYBUF) verdünnt.

10 µl Probe + **390 µl** ASYBUF, gut mischen

Dies entspricht nun einer **Gesamtverdünnung** von **1:40**.

100 µl der Verdünnung 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.

Kalibrator, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf EDN zu untersuchen sind, 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 (peroxidase-markiert) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes EDN – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Farbe ist dem EDN-Gehalt direkt proportional. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Musterkalibrierkurve lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (15-30°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Kontrollen/Kalibrator/Leerwert/Proben im Protokollblatt.

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit. 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 Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Kalibrator/Kontrollen/Leerwert/vorbereitete Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	10–20 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.

11.	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.
-----	---

* 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

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log-Modell unter Verwendung der Angaben zum Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators, welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

Abhängig von der verwendeten Software kann der Kalibrationskurvenverlauf sowohl durch die Parameter A, B, C und D als auch durch die Wertepaare aus Konzentration und optischer Dichte der Standards beschrieben werden.

Achtung: Die Parameterwerte müssen genau eingegeben werden, da selbst geringe Abweichungen der Zahlenwerte zu massiven Störungen der Auswertung führen können.

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.

Stuhl- und Urinproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 400**, bei einer Verdünnung von 1:1 000 mit dem **Verdünnungsfaktor 1 000** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Serum-/ Plasmaproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 40** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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

9. EINSCHRÄNKUNGEN

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

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

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

LoB × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

Referenzwerte

1 g Stuhl entspricht 1 ml.

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

Anhand einer laborinternen Studie mit Stuhlproben von augenscheinlich Gesunden (n = 53) wurde ein Mittelwert von 357,64 ng/ml Stuhl (Standardabweichung: 500,1 ng/ml) ermittelt. Als oberer Normwert wird vorläufig der Mittelwert + 2 SD (= 1 357,8 ng/ml) 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 Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 28

Die Wiederholbarkeit wurde mit 3 Stuhlproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	1,53	7,2
2	3,73	8,4
3	0,50	8,4

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 20

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Stuhlproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	1,84	12,4
2	3,62	6,8

Analytische Sensitivität

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

Leerwert (*limit of blank*, LoB)

0,185 ng/ml

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 3 Stuhlproben wurden dafür mit bekannten EDN-Konzentrationen versetzt und gemessen.

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
0,28	3,0	3,28	3,79	115,43
	4,0	4,28	4,61	107,64
	5,0	5,28	4,42	83,78
	8,0	8,28	7,39	89,24

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
0,67	1,5	2,17	2,18	100,41
	2,0	2,67	2,47	92,44
	2,5	3,17	2,96	93,38
	4,0	4,67	4,55	97,41
1,29	0,5	1,79	2,03	112,93
	1,5	2,79	3,22	115,32
	2,0	3,29	3,71	112,72
	3,5	4,79	5,52	115,04

Linearität

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

Für EDN in Serum, Plasma, Urin und Stuhl wurde in Bezug auf die Standardkurve ein lineares Verhalten im Bereich von 0,42 bis 3,99 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/ml]	Gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:200	3,359	3,359	100,00
	1:400	1,679	1,736	103,36
	1:800	0,840	0,993	118,26
	1:1 600	0,420	0,558	132,99
B	1:200	3,990	3,990	100,00
	1:400	1,995	2,257	113,10
	1:800	0,998	1,156	115,84
	1:1 600	0,499	0,547	109,70

Analytische Spezifität

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

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration [ng/ml]	Ermittelt [OD]	Fazit
Laktoferrin	240	0,009	< LoB
Sekretorische IgA	600	0,008	< LoB
Humanes Albumin	800	0,007	< LoB
PMN-Elastase	10	0,008	< 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 beigefügten 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®* und *IDK Extract®* sind Marken der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Konikoff, M.R. et al., 2006. Potential of blood eosinophils, eosinophil-derived neurotoxin, and eotaxin-3 as biomarkers of eosinophilic esophagitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, **4**(11), pp.1328–36.
2. Lotfi, R. & Lotze, M.T., 2008. Eosinophils induce DC maturation, regulating immunity. *Journal of leukocyte biology*, **83**(3), pp.456–60.
3. Bentz, S. et al., 2010. Clinical relevance of IgG antibodies against food antigens in Crohn's disease: a double-blind cross-over diet intervention study. *Digestion*, **81**(4), pp.252–64.
4. Kalach, N. et al., 2013. 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 : CCLM / FESCC*, **51**(2), pp.351–61.

Verwendete Symbole:

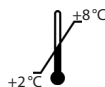
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

IDK[®] EDN ELISA

For the in vitro determination of EDN (eosinophil-derived neurotoxin) in stool, urine, serum and plasma

Valid from 2022-02-22

REF **K 6821**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL SUPPLIED	19
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	20
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	21
<i>Sample storage</i>	21
<i>Extraction of the stool samples</i>	22
<i>Dilution of samples</i>	23
7. ASSAY PROCEDURE	24
<i>Principle of the test</i>	24
<i>Test procedure</i>	24
8. RESULTS	25
9. LIMITATIONS	26
10. QUALITY CONTROL	26
<i>Reference ranges</i>	27
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	27
<i>Accuracy – Precision</i>	27
<i>Analytical sensitivity</i>	28
<i>Accuracy – Trueness</i>	28
<i>Linearity</i>	28
<i>Analytical specificity</i>	29
12. PRECAUTIONS	29
13. TECHNICAL HINTS	30
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	30
15. REFERENCES	31

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of EDN (eosinophil-derived neurotoxin, also known as RNASE2 or eosinophil protein x [EPX]), in serum, plasma, urine and stool. 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 (e.g. chronic inflammatory bowel disease, colon cancer)
- Proof of intestinal parasites / parasitoses

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6821	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 6999.C.100	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate IDK Extract® 2.5x	2 x 100 ml
K 6821	ASYBUF	Assay buffer, ready-to-use	1 x 50 ml
K 6821	CAL	Calibrator, lyophilised	2 x 1 vial

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6821	CTRL 1	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6821	CTRL 2	Control, lyophilised (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6821	CONJ	Conjugate concentrate, polyclonal peroxidase-labelled antibody	1 x 200 µl
K 0002.15	SUB	Substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

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 10–1 000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3 000 g
- 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 calibrator (CAL)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. Before use, the CAL and CTRL have to be reconstituted with **500 µl of ultrapure water** and mixed by gentle inversion to ensure complete reconstitution. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly. **Calibrator and controls** (reconstituted CAL and CTRL) **can be stored at 2–8°C for 4 weeks**.
- Use **100 µl** of **wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) as **blank**.
- **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 storage

The stool sample stability is as follows:

Raw stool can be stored for 72 hours at room temperature (15–30°C) and 4°C or for 8 weeks at -20°C.

Stool extracts (1:100) can be stored for 1 day at room temperature (15–30°C), for 5 days at 2–8°C or for seven days at -20°C. Avoid more than two freeze-thaw cycles.

Extraction of the stool samples

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

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

Stool sample tube – Instructions for use

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

SAS with 1.5 ml sample extraction buffer:

Applied amount of stool: 15 mg

Buffer Volume: 1.5 ml

Dilution Factor: 1:100

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

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty stool sample tube** with **1.5 ml sample extraction buffer** (1:2.5 diluted *IDK Extract*®) before using it with the sample. **Important:** Allow the sample extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Vortex the tube well until no stool sample remains in the notches. **Important:** Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with sample extraction buffer for ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~ 10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution I: 1:100

Dilution of samples

Stool samples

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

100 µl dilution I + **300 µl** wash buffer = **dilution II** (1:4)

This results in a **final dilution** of **1:400***.

* A dilution of 1:1000 is recommended for sample collectives with expected elevated values.

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

Urine samples

We recommend to analyze urine collected within 24 hours, whereby the EDN concentration is expressed as mg/day. If a 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 *g* and 4 °C. The supernatant is then transferred to a new plastic tube.

Prior to analysis, the urine samples should be diluted **1:400** with assay buffer (ASY-BUF).

For example:

10 µl sample + **190 µl** ASYBUF = **dilution I** (1:20)

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

This results in a **final dilution** of **1:400**.

For analysis, pipet **100 µl of dilution II** 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 1:40 with assay buffer (ASYBUF), prior to analysis.

10 µl sample + **390 µl** ASYBUF

This results in a **final dilution** of **1:40**.

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

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

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

Calibrator, controls and diluted patient samples which are assayed for EDN are added to wells of microplate coated with a high affine monoclonal anti-human EDN antibody. During the first incubation step, EDN in the samples is bound by the immobilised antibody. Then a peroxidase-labelled conjugate is added to each well and the following complex is formed: capture antibody – human EDN – peroxidase conjugate. Tetramethylbenzidine is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the EDN concentration of the sample. Samples are quantified by referring their optical density to a lot-dependent master calibration curve and the use of the calibrator that is run with each test.

Test procedure

Prior to use in the assay, allow all reagents and samples to come to room temperature (15–30°C) and mix well.

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

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

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl calibrator/controls/blank/prepared samples into the respective wells.
3.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal shaker* .

4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (15–30 °C) on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 10–20 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
11.	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.

* 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

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the standard curve of the respective kit lot and the calibrator value (CAL). All essential information on the standard curve is provided on the QC data sheet of the respective product lot.

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A,B,C and D. In both cases the optical density of the calibrator is essential. Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

Caution: Please make sure that all parameters and values are transferred accurately into your software as minor deviations can cause severe errors during evaluation.

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 and urine samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor 400** to get the actual concentrations, or by the **dilution factor 1 000** when a dilution of 1:1 000 has been used.

Serum/plasma samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor 40** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with 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 (see definition below) range 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 ranges

1 g stool is equivalent to 1 ml.

Stool (n = 53): 357.6 ng/ml (mean value)

Based on Immundiagnostik AG studies of evidently healthy persons (n = 53), a mean value of 357,64 ng/ml stool (standard deviation: 500,1 ng/ml) was estimated. The mean value + 2 SD (= 1357,8 ng/ml) should be considered as the preliminary 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 reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 28

The repeatability was assessed with 3 stool samples under **constant** parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	1.53	7.2
2	3.73	8.4
3	0.50	8.4

Reproducibility (Inter-Assay); n = 20

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

Sample	Mean value [ng/ml]	CV [%]
1	1.84	12.4
2	3.62	6.8

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

0.185 ng/ml

Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, EDN spikes with known concentrations were added to 3 different stool samples.

Sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
0.28	3.0	3.28	3.79	115.43
	4.0	4.28	4.61	107.64
	5.0	5.28	4.42	83.78
	8.0	8.28	7.39	89.24
0.67	1.5	2.17	2.18	100.41
	2.0	2.67	2.47	92.44
	2.5	3.17	2.96	93.38
	4.0	4.67	4.55	97.41
1.29	0.5	1.79	2.03	112.93
	1.5	2.79	3.22	115.32
	2.0	3.29	3.71	112.72
	3.5	4.79	5.52	115.04

Linearity

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

For EDN in serum plasma, stool and urine, the method has been demonstrated to be linear from 0.42 to 3.99 ng/ml based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [ng/ml]	Obtained [ng/ml]	Recovery [%]
A	1:200	3.359	3.359	100.00
	1:400	1.679	1.736	103.36
	1:800	0.840	0.993	118.26
	1:1 600	0.420	0.558	132.99
B	1:200	3.990	3.990	100.00
	1:400	1.995	2.257	113.10
	1:800	0.998	1.156	115.84
	1:1 600	0.499	0.547	109.70

Analytical specificity

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

Substance tested	Concentration added [ng/ml]	Obtained [OD]	Conclusion
Lactoferrin	240	0.009	< LoB
Secretory IgA	600	0.008	< LoB
Human albumin	800	0.007	< LoB
PMN elastase	10	0.008	< 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 must 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 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®* and *IDK Extract®* are trademarks 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 sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Konikoff, M.R. et al., 2006. Potential of blood eosinophils, eosinophil-derived neurotoxin, and eotaxin-3 as biomarkers of eosinophilic esophagitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, **4**(11), pp.1328–36.
2. Lotfi, R. & Lotze, M.T., 2008. Eosinophils induce DC maturation, regulating immunity. *Journal of leukocyte biology*, **83**(3), pp.456–60.
3. Bentz, S. et al., 2010. Clinical relevance of IgG antibodies against food antigens in Crohn's disease: a double-blind cross-over diet intervention study. *Digestion*, **81**(4), pp.252–64.
4. Kalach, N. et al., 2013. 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 : CCLM / FESCC*, **51**(2), pp.351–61.

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