

Arbeitsanleitung/Manual

Vorläufig / preliminary

# $\beta$ -Defensin 2 ELISA Kit

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

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

Gültig ab/valid from 20.09.2005

Artikelnummer/Catalogue No.: K 6500

Packungsgröße/Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung/Storage: 2 - 8 °C



Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b> _____	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b> _____	<b>2</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b> _____	<b>3</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b> _____	<b>3</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b> _____	<b>4</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b> _____	<b>4</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN</b> _____	<b>5</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b> _____	<b>6</b>
STUHLPROBENEXTRAKTION	6
PROBENVERDÜNNUNG	8
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b> _____	<b>8</b>
HINWEISE	8
PIPETTIERSCHEMA	9
<b>10. ERGEBNISSE</b> _____	<b>10</b>
MUSTEREICHKURVE	11
<b>11. EINSCHRÄNKUNGEN</b> _____	<b>12</b>
<b>12. QUALITÄTSKONTROLLE</b> _____	<b>12</b>
<b>13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b> _____	<b>12</b>

---

Table of content	Page
<b>1. INTENDED USE</b> _____	<b>14</b>
<b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST</b> _____	<b>14</b>
<b>3. TEST PRINCIPLE</b> _____	<b>15</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b> _____	<b>15</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b> _____	<b>16</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b> _____	<b>16</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b> _____	<b>17</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b> _____	<b>18</b>
STOOL EXTRACTION	18
DILUTION OF SAMPLES	20
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b> _____	<b>20</b>
PROCEDURAL NOTES	20
TEST PROCEDURE	21
<b>10. RESULTS</b> _____	<b>22</b>
TYPICAL CALIBRATION CURVE	23
<b>11. LIMITATIONS</b> _____	<b>24</b>
<b>12. QUALITY CONTROL</b> _____	<b>24</b>
<b>13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b> _____	<b>24</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 sogenannte probiotische Bakterien die  $\beta$ -Defensin-Bildung anregen, ist ebenfalls Thema derzeitiger Untersuchungen.

### Indikationen:

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

### 3. TESTPRINZIP

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 2. polyklonalen Antikörpers, der biotinyliert ist. Dieser wird mit Peroxidase markiertem Streptavidin detektiert. Die gebundene Enzymmenge ist dem  $\beta$ -Defensin 2-Gehalt direkt proportional. Als Substrat für die Peroxidase wird TMB eingesetzt. Die gebildete, chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen.

### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
K 6500MTP	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6500WP	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6500A2	2. Antikörper (Ziege anti $\beta$ -Defensin 2- biotinyliert)	200 $\mu$ l
K 6500K	Konjugat, (Streptavidin, Peroxidase- markiert)	50 $\mu$ l
K 6500ST	Standards, lyophilisiert	4x 5 vials
K 6500KO	Kontrolle, lyophilisiert	4x 1 vials
K 6500TMB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6500AC	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	7 ml

## 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mischer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Beim Mehrfachansatz der Platte ist bitte darauf zu achten, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden.**
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** muss vor Gebrauch **1:10** in aqua bidest. verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest). Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Konzentraten kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C 1 Monat** (in einem geschlossenen Gefäß) haltbar.
- Die lyophilisierten **Standards und Kontrollen** sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Standards werden mit **500 µl** aqua bidest. rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen sind nicht stabil.**

- Der **2. Antikörper** (biotinyliert) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:100** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 100 µl Konjugat + 10 ml Waschpuffer). Unverdünnter Antikörper ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). Verdünnter Antikörper kann **nicht** aufbewahrt werden.
- Das **Konjugat** (Peroxidase markiert) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:1000** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 10 µl Konjugat + 10 ml Waschpuffer). Unverdünnter Antikörper ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). Verdünnter Antikörper kann **nicht** aufbewahrt werden.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter  $H_2SO_4$ .  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

### *Stuhlprobenextraktion*

Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

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

**Puffervolumen konstant - 5 ml**

**Verdünnungsfaktor konstant - 1:50**

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

**Puffervolumen konstant - 5 ml**

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

Einwaage [mg]	Verdünnungsfaktor
80	62.5
82	60.9
84	59.5
86	58.1
88	56.8
90	55.6
92	54.3
94	53.2
96	52.1
98	51.0
<b>100</b>	<b>50</b>

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

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

**Puffervolumen variabel**

**Verdünnungsfaktor konstant - 1:50**

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

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

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

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

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

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

## *Probenverdünnung*

### **Stuhlproben**

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

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

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

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

## **9. TESTDURCHFÜHRUNG**

### *Hinweise*

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumen sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer, nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

## *Pipettierschema*

Wir empfehlen Doppelbestimmungen durchzuführen.

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

## 10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Tests empfehlen wir:

1. 4-Parameter-Funktion

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

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

### Stuhlproben:

Die ermittelte  $\beta$ -Defensin2 Konzentration der Stuhlprobe wird auf Grund der Probenvorbereitung wie im folgendem Beispiel berechnet:

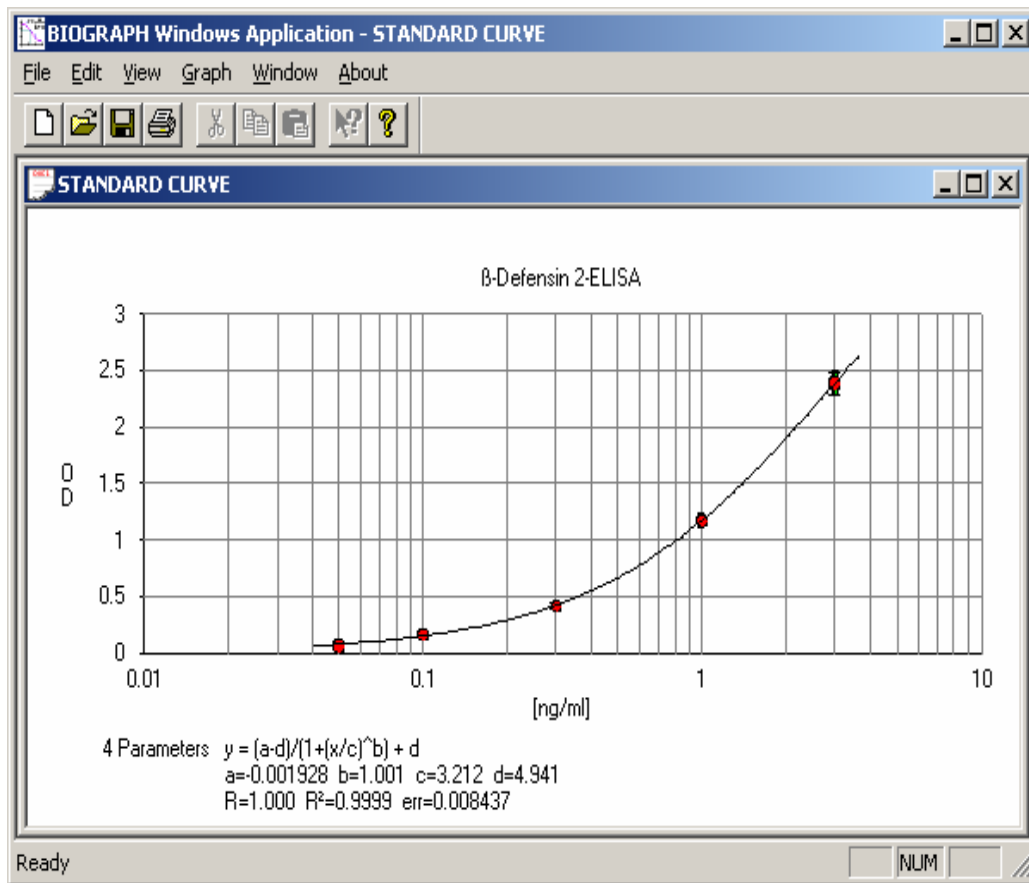
#### **Probenvorbereitung 1 und 2b: Verdünnungsfaktor konstant: 50**

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

#### **Probenvorbereitung 2a: Der Verdünnungsfaktor ist variabel**

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

## Mustereichkurve



STD	OD1	OD2	mean OD	CV (%)	Conc. [ng/ml]
0	0.043	0.047	0.045	5.2	0
1	0.142	0.143	0.143	0.6	0.1
2	0.433	0.436	0.435	0.5	0.3
3	1.152	1.116	1.134	2.3	1.0
4	1.455	1.486	1.471	1.5	3.0

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden.

## **11. EINSCHRÄNKUNGEN**

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

## **12. QUALITÄTSKONTROLLE**

Für die Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung unabhängiger externer Kontrollen.

## **13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST**

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

**Manual**  
Preliminary

# β-Defensin 2 ELISA Kit

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

Gültig ab / valid from 13.10.2005

Artikelnummer / Catalogue No.: K 6500

Packungsgröße / Package size: 96 Tests/96 determinations

Lagerung / Storage: 2 - 8 °C



## 1. INTENDED USE

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

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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 are 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. TEST PRINCIPLE

The  $\beta$ -defensin 2 in standard and samples is bound to an available excess of polyclonal antibodies against  $\beta$ -defensin 2, which are immobilised on the surface of the microtitre 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 biotinylated. This antibody is detected with horseradish peroxidase labelled streptavidin. The amount of converted substrate by Peroxidase is directly proportional to the amount of bound  $\beta$ -defensin 2 and can be determined photometrically at 450 nm.

### 4. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No.	Kit Components	Quantity
K 6500MTP	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6500WP	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6500A2	2 <sup>nd</sup> Antibody (Goat anti $\beta$ -Defensin 2, biotinylated)	200 $\mu$ l
K 6500K	Conjugate, (Streptavidin, HRP-conjugated)	50 $\mu$ l
K 6500ST	Calibrator, lyophilized	4 x 5 vials
K 6500KO	Control, lyophilized	1 vial
K 6500TMB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6500AC	ELISA stop solution, ready to use	7 ml

## 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettes calibrated to deliver 10-1000 µl and disposable tips
- Horizontal shaker for microtiter plates
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Usual laboratory plastic or glass vials (disposable vials)
- Microplate reader 450 nm

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, make sure that the reagents are carefully stored as mentioned. Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.
- The reagent tubes with the lower amounts should be centrifuged before use, to guarantee that the required amount is available for use.
- The **washing buffer concentrate** should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (add 900 ml aqua bidest. to 100 ml concentrate). Crystals could be built due to high salt concentration. The crystals have to be resuspended before dilution of the buffer solutions by the use of a water bath (37°C). The **buffer concentrates** are stable at **2-8°C** until the given expiry date (see label). **Diluted solutions** could be stored at **2-8°C for 1 month**.
- The **calibrators** and **controls** have to be reconstituted with **500 µl** aqua bidest. Allow the vial to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle conversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls are not stable.**

- The **2<sup>nd</sup> antibody** (biotinylated) has to be diluted **1:100** in wash buffer (add e.g. 100 µl 2<sup>nd</sup> antibody to 10 ml wash buffer). The undiluted antibody is stable at -20°C until the expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and could not be stored.**
- The **Conjugate** (peroxidase labeled) has to be diluted **1:1000** in wash buffer (add e.g. 10 µl Conjugate to 10 ml wash buffer). The undiluted antibody is stable at -20°C until the expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and could not be stored.**

## 7. PRECAUTIONS

- The calibrators and controls contain human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HCV or other infectious agents are absent, these reagents should be handled as if potentially infectious.
- 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 out immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### *Stool Extraction*

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

1. We recommend the use of a stool sample preparation kit for dosing of 100 mg of stool sample (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; cat # 745804). Add 5 ml buffer to the stool sample in the preparation kit.

**Constant buffer volume: 5 ml**

**Constant dilution factor: 1 : 50**

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

**Constant buffer volume: 5 ml**

**Variable dilution factor**

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

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

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

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

**Variable buffer volume**

**Constant dilution factor: 1 : 50**

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

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

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

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

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

### *Dilution of samples*

#### **Stool samples**

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

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

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

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

## **9. ASSAY PROCEDURE**

### *Procedural notes*

- Do not mix different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage.
- Carry out the assay with the actual manual delivered with the kit.

## *Test procedure*

We recommend to carry out the tests in duplicate.

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

## 10. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. However, we recommend to use option 1. 4-parameter-algorithm

### 1. 4-parameter-algorithm

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

### 2. Point-to-point-calculation

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

### 3. Spline-algorithm

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

The pairs of values should be examined for plausibility before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with used program, a manual control of the paired values should be made.

## Faeces

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

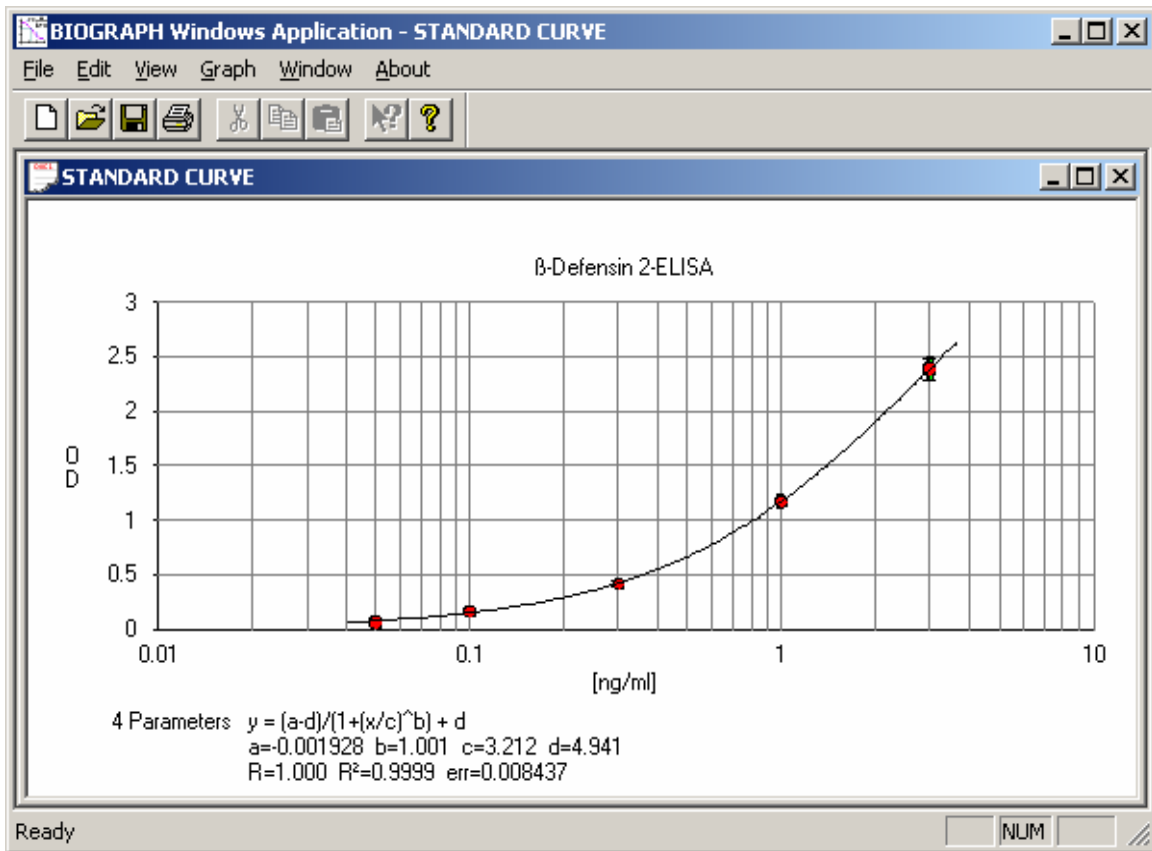
**Sample preparation 1 and 2b:**                      **Constant dilution factor : 50**

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

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

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

*Typical calibration curve*



STD	OD1	OD2	mean OD	CV (%)	Conc. [ng/ml]
0	0.043	0.047	0.045	5.2	0
1	0.142	0.143	0.143	0.6	0.1
2	0.433	0.436	0.435	0.5	0.3
3	1.152	1.116	1.134	2.3	1.0
4	1.455	1.486	1.471	1.5	3.0

These data are for demonstration only and cannot be used instead of data obtained from the actual assay.

## 11. LIMITATIONS

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

## 12. QUALITY CONTROL

**Immundiagnostik recommends commercial control samples for internal quality control.**

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

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

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