

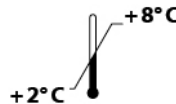
# EDN ELISA Kit

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

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

Gültig ab / Valid from 2015-03-24

REF **K 6811**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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

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



# Inhalt

<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>3</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<i>Lagerung</i>	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	6
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>7</b>
<i>Testprinzip</i>	7
<i>Pipettierschema</i>	7
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>9</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>9</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>10</b>
<i>Referenzwerte</i>	10
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Spike-Wiederfindung</i>	11
<i>Spezifität</i>	11
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	12
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>12</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>13</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>13</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>14</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene ELISA ist für die quantitative 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 Parasitosen / Parasitosen

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6811	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 6811	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10 x	2 x 100 ml
K 6811	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	2 x 100 ml
K 6811	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	50 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6811	STD	Standard, lyophilisiert	2 x 5 vials
K 6811	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6811	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 1 vial
K 6811	CONJ	Konjugat, polyklonaler peroxidase-markierter Antikörper	200 µl
K 6811	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6811	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

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

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 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 der Platte darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 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 der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Der **WASH-BUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **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 der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen 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 bei **2–8°C drei Monate** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Die lyophilisierten STD (Standards) und CTRL (Kontrollen)** sind bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die Standards und Kontrollen werden mit **500 µl Reinstwasser** rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen können 4 Wochen bei 2–8°C gelagert werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird un-mittelbar vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeits-datum stabil. **Konjugat (1:101 verdünntes CONJ) ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### Lagerung

**Rohstuhl** kann 72 Stunden bei RT (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 **verdünnte Extraktionspuffer *IDK Extract***® wird als Probenextraktionspuffer verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

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

##### ***Stuhlröhrchen - Anwendung***

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

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

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 Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer *IDK Extract*® **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (orangefarbenes 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 mischen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. 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 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)

**Endverdünnung: 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 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

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

Zum Beispiel:

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

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

**Endverdünnung: 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 ASYBUF** (Assaypuffer) verdünnt.

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

**Endverdünnung: 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.

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

### *Pipettierschema*

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 STD/SAMPLE/CTRL (Standards/Proben/Kontrollen) im Protokollblatt.

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt 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 Imundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte <b>vor Gebrauch 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen</b> . Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
2.	Pipettieren Sie <b>100 µl STD/SAMPLE/CTRL</b> (Standards/Proben/Kontrollen) in die Mikrotiterstreifen.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.
4.	Den Inhalt der Platte verwerfen und <b>5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen</b> . Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5.	Pipettieren Sie <b>100 µl Conjugat</b> in alle Vertiefungen.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30°C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Den Inhalt der Platte verwerfen und <b>5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen</b> . Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8.	Pipettieren Sie <b>100 µl SUB</b> (Substrat) in alle Vertiefungen.
9.	10–20 Minuten bei Raumtemperatur (15–30°C) im Dunkeln inkubieren*.
10.	Pipettieren Sie <b>100 µl STOP</b> (Stopplösung) in alle Vertiefungen, 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.

\* 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.

### Stuhl- und Urinproben

Um die EDN-Konzentration in Stuhl- und Urinproben zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor **400**, bei einer Verdünnung von 1:1000 mit **1000** multipliziert.

### Serum-/ Plasmaproben

Um die EDN-Konzentration in Serum/Plasma zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor **40** 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) müssen 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:

$$\text{höchste Konzentration der Standardkurve} \times \text{Probenverdünnungsfaktor}$$

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$\text{LoB} \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### Referenzwerte

1 g Stuhl entspricht 1 ml.

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

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

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

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

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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

Zwei Patientenproben wurden im EDN-ELISA gemessen.

#### Intra-Assay (n = 23)

Probe	EDN [ng/ml]	VK [%]
1	303,6	7,0
2	760,5	5,7

**Inter-Assay (n = 14)**

Probe	EDN [ng/ml]	VK [%]
1	378,6	9,5
2	722,9	6,2

*Analytische Sensitivität*

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 + 3 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 21-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,164 ng/ml.

*Spike-Wiederfindung*

Zwei Proben wurden mit 4 unterschiedlichen EDN-Standardmengen versetzt und gemessen (n = 2).

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

*Spezifität*

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die EDN-Reaktivität:

- Laktoferrin 0%
- PMN Elastase 0%
- sIgA 0%
- Albumin 0%

### Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Patientenproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2)

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

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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 giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.









### 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

## 15. LITERATUR

1. Konikoff, M. R. et al. Potential of blood eosinophils, eosinophil-derived neurotoxin, and eotaxin-3 as biomarkers of eosinophilic esophagitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 1328–36 (2006).
2. Lotfi, R. & Lotze, M. T. Eosinophils induce DC maturation, regulating immunity. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 456–60 (2008).
3. Bentz, S. et al. Clinical relevance of IgG antibodies against food antigens in Crohn's disease: a double-blind cross-over diet intervention study. *Digestion* **81**, 252–64 (2010).
4. 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. *Clin. Chem. Lab. Med.* **51**, 351–61 (2013).

### Verwendete Symbole:

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



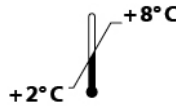
## Manual

# EDN ELISA Kit

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

Valid from 2015-03-24

REF **K 6811**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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

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

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>17</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>18</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>19</b>
<i>Sample storage</i>	19
<i>Extraction of the stool samples</i>	20
<i>Dilution of samples</i>	21
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>22</b>
<i>Principle of the test</i>	22
<i>Test procedure</i>	22
<b>8. RESULTS</b>	<b>23</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>24</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>24</b>
<i>Reference ranges</i>	25
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>25</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	25
<i>Specificity</i>	25
<i>Analytical Sensitivity</i>	26
<i>Spiking Recovery</i>	26
<i>Dilution recovery</i>	26
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>27</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>27</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>27</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>28</b>

## 1. INTENDED USE

The described ELISA is 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. It is for in vitro diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

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

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

### Indications

- Morbus Crohn
- Proof of a food allergy and incompatibility
- Assessment of an elimination diet
- Proof of damaged integrity of the intestinal mucous membrane (e.g. chronic inflammatory bowel disease, colon cancer)
- Proof of intestinal parasites / parasitoses

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6811	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6811	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6811	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract</i> ® 2.5x	2 x 100 ml
K 6811	ASYBUF	Assay buffer, ready to use	50 ml
K 6811	STD	Standard, lyophilized	2 x 5 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6811	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6811	CTRL	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 6811	CONJ	Conjugate, polyclonal peroxidase-labeled antibody	200 µl
K 6811	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6811	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

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

#### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water\*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure 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)** should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. 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 one month**.
- **Preparation of the extraction buffer:** The **extraction buffer concentrate IDK Extract®** must be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml *IDK Extract®* + 150 ml ultra pure water ), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. Before dilution, the crystals must 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 three months**.
- The **lyophilized standards (STD)** and **controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Before use, the **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl of ultra pure water**. Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls can be stored at 2–8 °C for four weeks**.
- **Preparation of the conjugate:** The **conjugate concentrate (CONJ)** must be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until 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 of test package) when stored at **2–8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Sample storage*

**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*

**Diluted extraction buffer *IDK Extract***<sup>®</sup> 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** of ready to use *IDK Extract*<sup>®</sup> extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (orange part of cap) to open. Insert the orange 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) Shake 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*

#### **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)

**Final dilution: 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 1350 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 ASYBUF (assay buffer).

For example:

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

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

**Final dilution: 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 ASYBUF (assay buffer), prior to analysis.

**10 µl** sample + **390 µl** ASYBUF

**Final dilution: 1:40**

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

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

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

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

### *Test procedure*

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 STD /SAMPLE/CTRL (standards/sample/controls) on a protocol sheet.

Take the microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered 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.	Wash the pre-coated microtiter plate <b>5 x with 250 µl wash buffer before use</b> . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be tapped on absorbent paper.
2.	Add <b>100 µl of STD/SAMPLE/CTRL</b> (standard/sample/controls) into respective well.
3.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30°C) on a horizontal mixer.



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> into each well.
6.	Cover the plate tightly and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a horizontal mixer.
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 of SUB</b> (substrate) into each well.
9.	Incubate for <b>10–20 minutes</b> at room temperature (15–30 °C) in the dark*.
10.	Add <b>100 µl of STOP</b> (stop solution) into each well, mix thoroughly.
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.

\* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color 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 calibrator 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 pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the paired values should be evaluated manually.

### Stool and urine samples

For the calculation of the EDN concentration in stool and urine samples, the result must be multiplied by the dilution factor 400 or by 1000 when a dilution of 1:1000 has been used.

### Serum/plasma samples

For the calculation of the EDN concentration in plasma/serum the result must be multiplied by the dilution factor **40**.

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) must 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*

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik 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

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

**Urine** (n = 50): 81.8 (26.7–164.2) µg/mmol Creatinine

**Serum** (n = 52): 26.4 (8.3–66.4) ng/ml

**Plasma** (n = 52): 18.1 (6.2–49.8) ng/ml

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Precision and reproducibility

Two patient samples were measured using the assay.

#### Intra-Assay (n = 23)

Sample	EDN [ng/ml]	CV [%]
1	303.6	7.0
2	760.5	5.7

#### Inter-Assay (n = 14)

Sample	EDN [ng/ml]	CV [%]
1	378.6	9.5
2	722.9	6.2

### Specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to EDN. The specificity is calculated in percent, based on the cross-reactivity of these compounds with the anti-EDN antibody compared to the EDN antigen:

- Lactoferrin 0%
- PMN Elastase 0%
- sIgA 0%
- Albumin 0%

### Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 21 times. The detection limit was set as  $B_0 + 2 \text{ SD}$  and estimated to be 0.164 ng/ml.

### Spiking Recovery

Two samples were spiked with 4 different EDN standards and measured using this assay ( $n = 2$ ).

Sample	Unspiked sample [ng/ml]	Spike [ng/ml]	EDN expected [ng/ml]	EDN measured [ng/ml]
A	0.672	1.50	2.172	2.181
	0.672	2.00	2.672	2.546
	0.672	2.50	3.172	2.962
	0.672	4.00	4.672	4.551
B	1.294	0.50	1.794	1.994
	1.294	1.50	2.794	3.156
	1.294	2.00	3.294	3.674
	1.294	3.50	4.794	5.284

### Dilution recovery

Two patient samples were diluted and analyzed. The results are shown below ( $n = 2$ ):

Sample	Dilution	EDN expected [ng/ml]	EDN measured [ng/ml]
A	1:200	798.10	798.10
	1:400	451.30	399.05
	1:800	231.10	199.53
	1:1600	109.40	99.76
B	1:200	281.20	281.20
	1:400	175.40	140.60
	1:800	85.10	70.30
	1:1600	32.30	35.15

## 12. PRECAUTIONS

- 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 and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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 analyzed 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 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.

- 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. REFERENCES

1. Konikoff, M. R. et al. Potential of blood eosinophils, eosinophil-derived neurotoxin, and eotaxin-3 as biomarkers of eosinophilic esophagitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 1328–36 (2006).
2. Lotfi, R. & Lotze, M. T. Eosinophils induce DC maturation, regulating immunity. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 456–60 (2008).
3. Bentz, S. et al. Clinical relevance of IgG antibodies against food antigens in Crohn's disease: a double-blind cross-over diet intervention study. *Digestion* **81**, 252–64 (2010).
4. 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. *Clin. Chem. Lab. Med.* **51**, 351–61 (2013).

### Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> test
	Lot number		Use by