

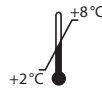
IDK[®] Zonulin ELISA Kit

Zur in-vitro-Bestimmung von Zonulin in Serum

For the in vitro determination of zonulin in serum

Gültig ab / Valid from 22.07.2015

REF K 5601



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
<i>Vorbereitung der Proben</i>	4
<i>Vorbereitung der Standards und Kontrollen</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	9
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Zonulin in Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Zonulin ist ein humanes Protein ähnlich dem Zonula-occludens-Toxin von *Vibrio cholerae*, das an der Regulation der interzellulären Kontakte (*tight junctions*) in der Darmwand beteiligt ist. Zonulin bindet an einen spezifischen Rezeptor an der Oberfläche der Epithelzellen der Darmbarriere und aktiviert eine Kaskade biochemischer Ereignisse, welche die Öffnung der *tight junctions* induzieren und als Folge die Durchlässigkeit der Darmepithelzellen erhöhen, so dass verschiedene Substanzen die Darmbarriere passieren und Autoimmunreaktionen auslösen können.

Die Arbeitsgruppe um Fasano hat festgestellt, dass bei Zöliakie- und Typ-1-Diabetes-mellitus-Patienten das Zonulin-Zonulinrezeptor-System stärker aktiviert ist. Patienten mit aktiver Zöliakie zeigen erhöhte Konzentrationen von Zonulin und Zonulin-Antikörpern im Vergleich zu Nicht-Zöliakiepatienten und Patienten in Remission unter glutenfreier Diät.

Im Hinblick auf den autoimmunbedingten Typ-1-Diabetes konnte in Versuchen mit Ratten gezeigt werden, dass der Anstieg der Zonulin-Spiegel und die erhöhte Durchlässigkeit der Darmwand einer Typ-1-Diabeteserkrankung zeitlich vorausgehen. Umgekehrt konnte im Tierexperiment ein Typ-1-Diabetes verhindert werden, wenn das Protein Zonulin blockiert wurde.

Darüber hinaus wurde berichtet, dass viele Zöliakiepatienten auch an anderen Autoimmunkrankheiten leiden. Es wird vermutet, dass bei der Entwicklung von Zöliakie und anderen Autoimmunerkrankungen, wie insulinabhängiger Diabetes, Multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis, erhöhte Zonulin-Spiegel einen entscheidenden Faktor darstellen.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 5601	MTP	Mikrotitermodul, beschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 5601	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 5601	DIL	Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 5601	TRACER	Tracerkonzentrat, biotinyliertes Zonulin	1 x 300 µl

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 5601	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidasemarkiertes Streptavidin	1 x 200 µl
K 5601	STD	Standards (lyophilisiert)	4 x 6 vials
K 5601	CTRL1	Kontrolle (lyophilisiert)	4 x 1 vial
K 5601	CTRL2	Kontrolle (lyophilisiert)	4 x 1 vial
K 5601	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 5601	STOP	ELISA-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 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel) aus Polypropylen
- Mikrotiterplattenphotometer

* 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. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits 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 zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.

- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (z. B. 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 **WASHBUF** 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.
- **Die lyophilisierten STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **STD** und **CTRL** werden **mit Reinstwasser rekonstituiert** (Volumen und Konzentration siehe entsprechende Produktspezifikation), zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen sind nicht stabil und können nicht aufbewahrt werden.**
- **Vorbereitung des Tracers:** Das **TRACER** (biotinyliertes Zonulin-Tracer-Konzentrat) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101 in Verdünnungspuffer** verdünnt (z. B. 150 µl TRACER + 15 ml DIL). Unverdünntes TRACER ist bei 2–8 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Tracer** (1:101 verdünntes TRACER) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (z. B. 100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Die **Serumprobenstabilität** ist wie folgt: 4 Wochen bei -20 °C

Vorbereitung der Proben

1.	Je 25 µl Serumprobe in entsprechend beschriftete Reaktionsgefäße pipettieren.
2.	475 µl Verdünnungspuffer zu jeder Probe zugeben, gut vortexen. Dies resultiert in einem Verdünnungsfaktor von 1:20.

- | | |
|----|---|
| 3. | Je 150 µl verdünnte Probe in beschriftete Reaktionsgefäße pipettieren und 150 µl Tracer zu jeder Probe zugeben, gut vortexen. |
|----|---|

Die Proben sind nun bereit für den Einsatz im Test.

Vorbereitung der Standards und Kontrollen

150 µl STD bzw. **CTRL** in entsprechend beschriftete Reaktionsgefäße pipettieren, mit **150 µl Tracer** versetzen, gut mischen.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven ELISA. Die zu untersuchenden Proben, Standards und Kontrollen werden mit einem biotinylierten Zonulin-Tracer versetzt und anschließend in einer mit einem polyklonalen anti-Zonulin-Antikörper beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das freie Zielantigen in den Proben mit dem biotinylierten Zonulin-Tracer um die Bindung der polyklonalen anti-Zonulin-Antikörper. Beim zweiten Inkubationsschritt wird peroxidasemarkiertes Streptavidin zugegeben, das an den biotinylierten Zonulin-Tracer bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d. h. mit steigender Zonulin-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration des an den anti-Zonulin-Antikörper gebundenen biotinylierten Zonulin-Tracers und das Signal nimmt ab. Aus den ermittelten Standardwerten wird eine Standardkurve, optische Dichte (Absorption bei 450 nm) gegen Standardkonzentration, erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben berechnet werden.

Pipettierschema

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

Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können in der 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.	100 µl der vorbereiteten STD (Standards), CTRL (Kontrollen) oder Proben in die Vertiefungen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.
3.	Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4.	100 µl Konjugat pro Vertiefung pipettieren.
5.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.
6.	Inhalt der Platte verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7.	100 µl SUB (Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
8.	10–20 Minuten bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren*.
9.	100 µl STOP (Stopplösung) pro Vertiefung zusetzen und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus kurz mischen.

10,	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 gemessen. Falls die Extinktion einer Probe oder eines Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm 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.

Serumproben

Der ermittelte Zonulin-Spiegel der Serumproben wird mit dem Verdünnungsfaktor 20 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:

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

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

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich Gesunden ($n = 40$) wurde ein Medianwert von 34 ng/ml (± 14 ng/ml) ermittelt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

Für Plasmaproben sind eigene Referenzbereiche zu erheben.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay ($n = 40$)

Probe	Zonulin [ng/ml]	VK [%]
1	43,9	3,4
2	38,4	6,0

Inter-Assay (n = 14)

Probe	Zonulin [ng/ml]	VK [%]
1	42,5	13,3
2	47,9	13,6

Analytische Sensitivität

Leerwert (*limit of blank, LoB*) 0,143 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection, LoD*) 0,225 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie:EP-17-A durchgeführt.

Wiederfindung in der Verdünnung

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

Probe	Verdünnung	Zonulin erwartet [ng/ml]	Zonulin gemessen [ng/ml]
A	1:20	36,7	36,7
	1:40	18,3	19,0
	1:80	9,2	9,9
	1:160	4,6	5,9
	1:320	2,3	3,1
	1:640	1,1	2,0
B	1:20	40,3	40,3
	1:40	20,4	20,1
	1:80	10,9	10,1
	1:160	5,6	5,0
	1:320	3,0	2,5
	1:640	2,3	1,3

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.
- 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 beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

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

15. LITERATUR

1. Fasano, A, T Not, W Wang, S Uzzau, I Berti, A Tommasini, and S E Goldblum. 2000. "Zonulin, a Newly Discovered Modulator of Intestinal Permeability, and Its Expression in Coeliac Disease." *Lancet* **355** (9214) (April 29): 1518–9. doi:10.1016/S0140-6736(00)02169-3.
2. Wang, W, S Uzzau, S E Goldblum, and A Fasano. 2000. "Human Zonulin, a Potential Modulator of Intestinal Tight Junctions." *Journal of Cell Science* **113** Pt 24 (December): 4435–40.
3. Fasano, A. 2001. "Intestinal Zonulin: Open Sesame!" *Gut* **49** (2) (August): 159–62.
4. Freemark, Michael, and Lynne L Levitsky. 2003. "Screening for Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes: Two Views of the Controversy." *Diabetes Care* **26** (6) (June): 1932–9.
5. Lazzarotto, Francesca, Daniela Basso, Mario Plebani, Alessandro Moscon, Renato Zanchetta, and Corrado Betterle. 2003. "Celiac Disease and Type 1 Diabetes." *Diabetes Care* **26** (1) (January): 248–9.
6. Watts, Tammara, Irene Berti, Anna Sapone, Tania Gerarduzzi, Tarcisio Not, Ronald Zielke, and Alessio Fasano. 2005. "Role of the Intestinal Tight Junction Modulator Zonulin in the Pathogenesis of Type I Diabetes in BB Diabetic-Prone Rats." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** (8)

(February 22): 2916–21. doi:10.1073/pnas.0500178102.

7. De Magistris, Maria Teresa. 2006. "Zonula Occludens Toxin as a New Promising Adjuvant for Mucosal Vaccines." *Vaccine* **24** Suppl 2 (April 12): S2–60–1.
8. Sapone, Anna, Laura de Magistris, Michelle Pietzak, Maria G Clemente, Amit Tripathi, Francesco Cucca, Rosanna Lampis, et al. 2006. "Zonulin Upregulation Is Associated with Increased Gut Permeability in Subjects with Type 1 Diabetes and Their Relatives." *Diabetes* **55** (5) (May 1): 1443–9. doi:55/5/1443 [pii].
9. Thomas, Karen E, Anna Sapone, Alessio Fasano, and Stefanie N Vogel. 2006. "Gliadin Stimulation of Murine Macrophage Inflammatory Gene Expression and Intestinal Permeability Are MyD88-Dependent: Role of the Innate Immune Response in Celiac Disease." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) **176** (4) (February 15): 2512–21.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

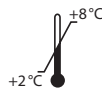
Manual

IDK[®] Zonulin ELISA Kit

For the in vitro determination of zonulin in serum

Valid from 22.07.2015

REF K 5601



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	15
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
<i>Sample preparation</i>	17
<i>Preparation of standards and controls</i>	17
7. ASSAY PROCEDURE	18
<i>Principle of the test</i>	18
<i>Test procedure</i>	18
8. RESULTS	19
9. LIMITATIONS	20
10. QUALITY CONTROL	20
<i>Reference range</i>	20
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
<i>Dilution recovery</i>	21
<i>Analytical Sensitivity</i>	21
<i>Precision and reproducibility</i>	21
12. PRECAUTIONS	22
13. TECHNICAL HINTS	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
15. REFERENCES	23

1. INTENDED USE

This ELISA is intended for the quantitative determination of zonulin in serum. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Zonulin is a novel human protein analogue to the zonula occludens toxin derived from *Vibrio cholerae* which participates in tight junctions between cells of the wall of the digestive tract. Zonulin binds to a specific receptor on the surface of intestinal epithelia and triggers a cascade of biochemical events which induces tight junction disassembly and a subsequent permeability increase of the intestinal epithelia, allowing some substances to pass through and activate immune reactions.

Dr. Fasano and his co-workers found out that the zonulin-zonulin-receptor-system is more activated in celiac disease and type 1 diabetes mellitus patients. Patients with active celiac disease showed higher levels of zonulin and anti-zonulin antibodies compared to non-celiac patients and patients in remission, who were on a gluten-free diet.

Concerning the autoimmune type 1 diabetes, in experiments with rats it could be demonstrated that elevated zonulin levels as well as increased intestinal permeability precede a type 1 diabetes disease. Conversely, type 1 diabetes could be prevented by inhibition of zonulin in animal experiments.

In addition, it was reported that many people who suffer from celiac disease also suffer from other autoimmune disorders. It is suggested that increased levels of zonulin are a contributing factor to the development of celiac disease and other autoimmune disorders such as insulin dependent diabetes, multiple sclerosis and rheumatoid arthritis.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 5601	MTP	Microtiter plate, coated	12 x 8 wells
K 5601	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 5601	DIL	Dilution buffer, ready to use	1 x 100 ml
K 5601	TRACER	Tracer concentrate, biotinylated zonulin	1 x 300 µl
K 5601	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labeled streptavidin	1 x 200 µl
K 5601	STD	Standards (lyophilized)	4 x 6 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 5601	CTRL1	Control (lyophilized)	4 x 1 vial
K 5601	CTRL2	Control (lyophilized)	4 x 1 vial
K 5601	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 5601	STOP	ELISA 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

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc. made from polypropylene
- Microtiter plate reader

* 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. PREPARATION AND STORAGE 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 ultra pure water **1:10** before use (e.g. 100 ml WASH-BUF + 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**.

- The **lyophilized STD** (standards) and **CTRL** (controls) are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Standards and controls have to be **reconstituted with ultra pure water** (volume and concentration, see product specification). Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and then mix thoroughly to ensure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls are not stable**.
- **Preparation of the tracer:** The **TRACER** (biotinylated zonulin-tracer concentrate) has to be diluted **1:101 in dilution buffer** (e.g. 150 µl TRACER + 15 ml DIL) immediately before use. The TRACER (biotinylated zonulin tracer concentrate) is stable at 2–8 °C until expiry date given on the label. **Tracer** (1:101 diluted TRACER) **is not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the conjugate:** Immediately before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (e.g. 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. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The **serum sample stability** is as follows: 4 weeks at -20 °C.

Sample preparation

1.	Pipet each 25 µl of serum samples in the respectively labeled reaction tubes.
2.	Add 475 µl of dilution buffer to each sample, vortex well. This results in a dilution factor of 20.
3.	Pipet 150 µl of diluted sample in labeled reaction tubes and add 150 µl of tracer to each sample, vortex well.

Preparation of standards and controls

Transfer **150 µl** of **STD** or **CTRL** in the correspondingly labeled reaction tubes, add **150 µl** of **tracer** and mix well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This assay is based on the method of competitive ELISA. As a first preparation step, a biotinylated zonulin tracer is added to the samples, standards and controls. Afterwards, aliquots of the treated samples, standards and controls are transferred and incubated in microtiter plate wells coated with polyclonal anti-zonulin antibodies. During the incubation, the free target antigen in the samples competes with the biotinylated zonulin tracer for the binding of the polyclonal anti-zonulin antibodies immobilized on the microtiter plate wells. The unbound components are removed by a washing step. During a second incubation step, peroxidase-labeled streptavidin, which binds to the biotinylated zonulin tracer, is added into each microtiter well. After a washing step to remove the unbound components, the peroxidase substrate tetramethylbenzidine (TMB) is added. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The colour changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour is inverse proportional to the zonulin concentration in the sample; this means, high zonulin concentration in the sample reduces the concentration of the biotinylated zonulin tracer bound to the immobilized anti-zonulin antibodies and lowers the photometric signal. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard.

Test procedure

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

Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips in the aluminium wrapper 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.	Add 100 µl of the prepared STD (standards), CTRL (controls) or samples into each well.
2.	Cover the strips and incubate for 1 hour shaking on a horizontal shaker at room temperature (15–30°C).

3.	Decant the contents of each well. Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
4.	Add 100 µl conjugate into each well.
5.	Cover the strips and incubate for 1 hour shaking on a horizontal mixer at room temperature (15–30 °C).
6.	Decant the contents of each well. Wash the microtiter plate 5 x with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
7.	Add 100 µl of SUB (substrate solution) into each well.
8.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature (15–30 °C)*.
9.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well and mix shortly in the ELISA reader using the shake option.
10.	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 a sample or a standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

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

8. RESULTS

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

1. 4 parameter algorithm

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

2. Point-to-point calculation

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

3. Spline algorithm

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

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

Serum samples

The obtained zonulin levels of serum samples have to be multiplied with the dilution factor of 20.

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 greater 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

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 range

Based on Immundiagnostik studies of serum samples of apparently healthy persons (n = 40), a median value of 34 ng/ml (\pm 14 ng/ml) was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.
Establish own reference ranges for plasma samples.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Dilution recovery

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

Sample	Dilution	Zonulin expected [ng/ml]	Zonulin measured [ng/ml]
A	1:20	36.7	36.7
	1:40	18.3	19.0
	1:80	9.2	9.9
	1:160	4.6	5.9
	1:320	2.3	3.1
	1:640	1.1	2.0
B	1:20	40.3	40.3
	1:40	20.4	20.1
	1:80	10.9	10.1
	1:160	5.6	5.0
	1:320	3.0	2.5
	1:640	2.3	1.3

Analytical Sensitivity

Limit of blank, LoB 0.143 ng/ml

Limit of detection, LoD 0.225 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI-Guideline:EP-17-A2.

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 40)

Sample	Zonulin [ng/ml]	CV [%]
1	43.9	3.4
2	38.4	6.0

Inter-Assay (n = 14)

Sample	Zonulin [ng/ml]	CV [%]
1	42.5	13.3
2	47.9	13.6

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 colour 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.
- 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.
- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Fasano, A, T Not, W Wang, S Uzzau, I Berti, A Tommasini, and S E Goldblum. 2000. "Zonulin, a Newly Discovered Modulator of Intestinal Permeability, and Its Expression in Coeliac Disease." *Lancet* **355** (9214) (April 29): 1518–9. doi:10.1016/S0140-6736(00)02169-3.
2. Wang, W, S Uzzau, S E Goldblum, and A Fasano. 2000. "Human Zonulin, a Potential Modulator of Intestinal Tight Junctions." *Journal of Cell Science* **113** Pt 24 (December): 4435–40.
3. Fasano, A. 2001. "Intestinal Zonulin: Open Sesame!" *Gut* **49** (2) (August): 159–62.
4. Freemark, Michael, and Lynne L Levitsky. 2003. "Screening for Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes: Two Views of the Controversy." *Diabetes Care* **26** (6) (June): 1932–9.
5. Lazzarotto, Francesca, Daniela Basso, Mario Plebani, Alessandro Moscon, Renato Zanchetta, and Corrado Betterle. 2003. "Celiac Disease and Type 1 Diabetes." *Diabetes Care* **26** (1) (January): 248–9.
6. Watts, Tammara, Irene Berti, Anna Sapone, Tania Gerarduzzi, Tarcisio Not, Ronald Zielke, and Alessio Fasano. 2005. "Role of the Intestinal Tight Junction Modulator Zonulin in the Pathogenesis of Type I Diabetes in BB Diabetic-Prone Rats." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** (8) (February 22): 2916–21. doi:10.1073/pnas.0500178102.
7. De Magistris, Maria Teresa. 2006. "Zonula Occludens Toxin as a New Promising

- Adjuvant for Mucosal Vaccines." *Vaccine* **24** Suppl 2 (April 12): S2–60–1.
8. Sapone, Anna, Laura de Magistris, Michelle Pietzak, Maria G Clemente, Amit Tripathi, Francesco Cucca, Rosanna Lampis, et al. 2006. "Zonulin Upregulation Is Associated with Increased Gut Permeability in Subjects with Type 1 Diabetes and Their Relatives." *Diabetes* **55** (5) (May 1): 1443–9. doi:55/5/1443 [pii].
 9. Thomas, Karen E, Anna Sapone, Alessio Fasano, and Stefanie N Vogel. 2006. "Gliadin Stimulation of Murine Macrophage Inflammatory Gene Expression and Intestinal Permeability Are MyD88-Dependent: Role of the Innate Immune Response in Celiac Disease." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) **176** (4) (February 15): 2512–21.

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