

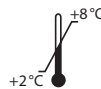
# $\beta$ -Defensin 2 ELISA Kit

*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 2014-10-30

**REF** K 6500



**IVD**



**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>Probenstabilität</i>	4
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<i>Probenverdünnung</i>	6
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	6
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>8</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>9</b>
<i>Referenzwerte</i>	9
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>9</b>
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>11</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>11</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>12</b>
<b>15. LITERATUR MIT VERWENDUNG DES K 6500 ELISA KITS</b>	<b>12</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

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

## 2. EINLEITUNG

Die endogen gebildeten  $\beta$ -Defensine sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und tragen durch ihre antimikrobielle Wirkung (z. B. *Escherichia coli* oder *Helicobacter pylori* gegenüber) zur Barrierefunktion des Darmepithels bei.

Neun verschiedene Defensine epithelialen Ursprungs wurden beim Menschen bislang beschrieben, u. a. die humanen  $\beta$ -Defensine 1, -2, und -3 (HBD-1, -2, -3). Die Expression dieser  $\beta$ -Defensine wird durch proinflammatorische Zytokine und durch Mikroorganismen (z. B. *E. coli*, *H. pylori* oder *P. aeruginosa*) induziert.

Einen  $\beta$ -Defensin-Mangel beobachtet man z. B. in der Darmmukosa von Morbus-Crohn-Patienten. Die dadurch eingeschränkte Barrierefunktion der Darmschleimhaut lässt eine vermehrte Invasion von Bakterien zu und führt damit möglicherweise zu den für M. Crohn typischen Entzündungen. Ob der  $\beta$ -Defensin-Mangel möglicherweise sogar bei der Entstehung des M. Crohn eine Rolle spielt, wird derzeit untersucht. Ob so genannte probiotische Bakterien die  $\beta$ -Defensin-Bildung anregen, ist ebenfalls Thema derzeitiger Untersuchungen.

### Indikationen

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

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6500MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12x 8 Vertiefungen
K 6500WP	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat 10x	2x 100 ml
K 6500K	CONJ	Konjugatkonzentrat, (Ziege-anti-beta-Defensin-2, peroxidasemarkiert)	200 $\mu$ l
K 6500ST	STD	Standards, lyophilisiert	2x 5 vials
K 6500SV	STDBUF	Standardverdünnungspuffer	20 ml
K 6500KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2x 1 vial
K 6500KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	2x 1 vial

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6500EP	IDK Extract®	Extraktionspufferkonzentrat <i>IDK Extract®</i> , 2,5 x	2 x 100 ml
K 6500TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	15 ml
K 6500AC	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

#### 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 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 anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 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. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- Das **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®** muss vor Gebrauch **1:2,5 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 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 **Extraktionspufferkonzentrat IDK Extract®** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Extraktionspuffer) 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 STDBUF** (Standardverdünnungspuffer) rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Standards und Kontrollen** sind **zwei Wochen** bei **2–8°C** haltbar bzw. **vier Wochen** bei **-20°C** und können nach dem **Auftauen einmal** wieder verwendet werden.
- Das **Konjugatkonzentrat** (CONJ) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101 in Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das Konzentrat ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat 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

### *Probenstabilität*

**Rohstuhl:** 48 Stunden bei 2–8°C, mindestens vier Wochen bei -20°C.

**Stuhlextrakt (1:100):** drei Tage bei Raumtemperatur (15–30°C), sieben Tage bei 2–8°C oder sieben Tage bei -20°C, maximal 2 Einfrier-/Auftauzyklen.

## 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:

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o.Ä.
- Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **1,5 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer **IDK Extract®** **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- 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.
- 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.
- Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u.Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlröhrchens (blauer Ring) zu-

sammen 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*

Der Überstand der Extraktion (**Verdünnung I**) wird **1:2** mit **Waschpuffer** verdünnt, z. B. 300 µl Überstand (Verdünnung I) + 300 µl Waschpuffer = 1:2 (**Verdünnung II**). Diese entspricht nun einer Gesamtverdünnung von **1:200**.

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

## **7. TESTDURCHFÜHRUNG**

### *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 Peroxidase-markiert ist. Die gebundene Enzymmenge ist dem  $\beta$ -Defensin 2-Gehalt direkt proportional. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten. 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*

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

Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Wir empfehlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.



1.	Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch <b>5 x mit je 250 µl Waschlösung</b> waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
2.	<b>100 µl STD</b> (Standards), <b>CTRL</b> (Kontrollen) und <b>Proben</b> in die Vertiefungen pipettieren.
3.	<b>1 Stunde bei Raumtemperatur</b> (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.
4.	Den Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschlösung</b> waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
5.	<b>100 µl verdünntes CONJ</b> (Konjugatlösung) pro Vertiefung pipettieren.
6.	<b>1 Stunde bei Raumtemperatur</b> (15–30 °C) unter Schütteln inkubieren.
7.	Den Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschlösung</b> waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
8.	<b>100 µl SUB</b> (TMB-Substrat) pro Vertiefung pipettieren.
9.	<b>10–20 Minuten*</b> (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur (15–30 °C) inkubieren.
10.	<b>100 µl STOP</b> (Stopplösung) zusetzen und kurz 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 Farbschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

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.

## 8. ERGEBNISSE

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

### 1. 4-Parameter-Funktion

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

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

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

### 3. Gewichtete Spline-Funktion

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

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

## Stuhlproben

Die ermittelte  $\beta$ -Defensin 2-Konzentration der Stuhlprobe wird auf Grund der Probenvorbereitung mit dem Verdünnungsfaktor **200** multipliziert, um die tatsächliche  $\beta$ -Defensin-2-Konzentration zu erhalten.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

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

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*LoB  $\times$  anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

## 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 = 101): 35 ng/ml Stuhl

Anhand einer laborinternen Studie mit Stuhlproben von augenscheinlich Gesunden (n = 101) wurde ein Mittelwert von 35 ng/ml Stuhl ermittelt. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den publizierten Ergebnissen überein, die mit dem  $\beta$ -Defensin ELISA Kit von Immundiagnostik ermittelt wurden:

Stuhl (n = 23 gesunde Kontrollen):  $31.0 \pm 15.4$  ng/g Stuhl<sup>[3]</sup>

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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay (n = 20)

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben wurde anhand einer Messserie geprüft. Dafür wurden zwei Proben 20-mal (n = 20) in einem  $\beta$ -Defensin-2-ELISA von einer Person gemessen.

Probe	$\beta$ -Defensin 2 [ng/ml]	VK [%]
1	17,7	4,1
2	81,4	3,0

**Inter-Assay (n = 20)**

Hierfür wurde die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an unterschiedlichen Tagen geprüft. Es wurden zwei Proben 20-mal (n = 20) in einem  $\beta$ -Defensin-2-ELISA an verschiedenen Tagen von unterschiedlichen Personen gemessen.

Probe	$\beta$ -Defensin 2 [ng/ml]	VK [%]
1	95,5	9,1
2	10,3	8,1

**Wiederfindung in der Verdünnung**

Zwei Proben wurden gemäß der Anleitung extrahiert und seriell verdünnt. Gegenübergestellt sind die gemessenen und die erwarteten  $\beta$ -Defensin-2-Konzentrationen.

Probe	Verdünnung	$\beta$ -Defensin 2 erwartet [ng/ml]	$\beta$ -Defensin 2 gemessen [ng/ml]
A	1:200	-	39,8
	1:400	19,9	19,8
	1:800	10,0	10,7
	1:1600	5,0	5,6
B	1:200	-	218,8
	1:400	109,4	105,7
	1:800	54,7	50,6
	1:1600	27,4	24,7

**Analytische Sensitivität****Limit of Blank**

Die berechnete Nachweisgrenze (**LoB; Limit of Blank**) wurde festgelegt als  $B_0 + 1.645 \cdot SD$ . Gemessen wurde 60-mal der Standard 1 (Leerwert). Die Ergebnisse wurden ermittelt in Bezug auf die Konzentration der Kalibrationskurve und ergaben

- ohne Berücksichtigung des Probenverdünnungsfaktors eine Nachweisgrenze von 0,02 ng/ml
- mit Berücksichtigung des Probenverdünnungsfaktors eine Nachweisgrenze von 2 ng/ml.

### Limit of Detection

Die berechnete Nachweisgrenze (**LoD; Limit of Detection**) wurde festgelegt als  $LoB + 1.645 * SD$ . Es wurden niedrige Proben 72-mal gemessen. Die Ergebnisse wurden ermittelt in Bezug auf die Konzentration der Kalibrationskurve und ergaben

- ohne Berücksichtigung des Probenverdünnungsfaktors eine Nachweisgrenze von 0,06 ng/ml
- mit Berücksichtigung des Probenverdünnungsfaktors eine Nachweisgrenze von 6 ng/ml.

## 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 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, zurückzusenden.

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

1. Döll, M., Hauss, R. & Spermezan, R. Immunmodulierende Wirkung von (1-3),(1-6)-beta-D-Glucan -- gezeigt an der Neopterin- und b-Defensin-Synthese. *Naturheilpraxis* **05**, 676–681 (2005).
2. Soto, E. et al. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine* **20**, 15–22 (2007).
3. Langhorst, J. et al. Activated innate immune system in irritable bowel syndrome? *Gut* **56**, 1325–6 (2007).
4. Schwab, M. et al. The dietary histone deacetylase inhibitor sulforaphane induces

- human beta-defensin-2 in intestinal epithelial cells. *Immunology* **125**, 241–51 (2008).
5. Schwartz, A., Huber, H. & Rusch, K. Human beta-defensin-2 levels in healthy individuals. *The American journal of gastroenterology* **104**, 2110; author reply 2110–1 (2009).
  6. Langhorst, J. et al. Elevated human beta-defensin-2 levels indicate an activation of the innate immune system in patients with irritable bowel syndrome. *The American journal of gastroenterology* **104**, 404–10 (2009).
  7. Kapel, N. et al. Fecal beta-defensin-2 in children with inflammatory bowel diseases. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **48**, 117–20 (2009).
  8. Richter, M. et al. Influence of gestational age, cesarean section, and type of feeding on fecal human beta-defensin 2 and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **51**, 103–5 (2010).
  9. Campeotto, F. et al. Fecal expression of human  $\beta$ -defensin-2 following birth. *Neonatology* **98**, 365–9 (2010).
  10. Shirin, T. et al. Antimicrobial peptides in the duodenum at the acute and convalescent stages in patients with diarrhea due to *Vibrio cholerae* O1 or enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **13**, 1111–20 (2011).
  11. Kabeerdoss, J. et al. Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12® on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition journal* **10**, 138 (2011).
  12. Savilahti, E. M. et al. Intestinal defensin secretion in infancy is associated with the emergence of sensitization and atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy* **42**, 405–11 (2012).
  13. Lahtinen, S. J. et al. Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM® modifies subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly. *Age* **34**, 133–43 (2012).
  14. Kalach, N. et al. Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow's milk allergy in toddlers. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **51**, 351–61 (2013).

### Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



In-Vitro-Diagnostikum



Hersteller



Chargenbezeichnung



Bestellnummer



Inhalt ausreichend für -cross-  
Prüfungen



Verwendbar bis



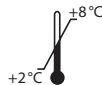
Manual

# $\beta$ -Defensin 2 ELISA Kit

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

Valid from 2014-10-30

**REF** K 6500



**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 stability</i>	19
<i>Extraction of the stool samples</i>	19
<i>Dilution of samples</i>	20
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>21</b>
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
<b>8. RESULTS</b>	<b>22</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>23</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>23</b>
<i>Reference range</i>	23
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>24</b>
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Dilution recovery</i>	24
<i>Analytical Sensitivity</i>	25
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>25</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>26</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>26</b>
<b>15. PUBLICATIONS USING K 6500 ELISA KIT</b>	<b>26</b>

## 1. INTENDED USE

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

## 2. INTRODUCTION

The  $\beta$ -defensins are an integral part of the congenital immune system and contribute with their antimicrobial effect to the barrier function of intestinal epithelial cells. Defensins exert a variable degree of antimicrobial activity against bacteria, fungi, and some enveloped viruses. Vertebrate defensins are classified as alpha- or beta-defensins, based on their pattern of disulfide bridges. Nine human defensins of epithelial origin have been found, three of them being  $\beta$ -defensins (HBD-1, -2 and -3). The expression of  $\beta$ -defensins is induced by the pro-inflammatory cytokines and also through microorganisms (e.g. *E. coli*, *H. pylori* or *P. aeruginosa*).

A  $\beta$ -defensin-2 deficiency can, for example, be observed in the intestinal mucous of patients with Crohn's disease. The defense system of the mucous membrane is therefore restricted and allows an increased invasion of bacteria, which could possibly lead to a typical infection in Crohn's disease patients.

Whether the  $\beta$ -defensin-2 deficiency could even play a role in the development of Crohn's disease is currently being researched. As is the possibility that it is the probiotic bacterium, which produces  $\beta$ -defensin.

### Indications

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

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6500MTP	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 6500WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6500K	CONJ	Conjugate concentrate, (Streptavidin, HRP-conjugated)	200 $\mu$ l
K 6500ST	STD	Standards, lyophilized	2 x 5 vials
K 6500SV	STDBUF	Standard dilution buffer	20 ml
K 6500KO1	CTRL	Control, lyophilized	2 x 1 vial
K 6500KO2	CTRL	Control, lyophilized	2 x 1 vial

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6500EP	IDK Extract®	Extraction buffer concentrate <i>IDK Extract® 2.5x</i>	2 x 100 ml
K 6500TMB	SUB	TMB substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	15 ml
K 6500AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml

#### 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.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 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 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.

- The **extraction buffer concentrate *IDK Extract***<sup>®</sup> must be diluted with ultra pure water **1:2.5** before use (100 ml concentrate + 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 **extraction buffer concentrate *IDK Extract***<sup>®</sup> is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** (extraction buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for three months**.
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl** of **STDBUF** (standard dilution buffer). Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Reconstituted standards and controls** can be stored for **two weeks at 2–8 °C** or for **four weeks at -20 °C** and be used **once after thawing**.
- The **conjugate concentrate** (CONJ) must be diluted **1:101 in wash buffer** (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The concentrate is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate 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 stability*

**Raw stool:** 48 hours at 2–8 °C, at least 4 weeks at -20 °C

**Stool extracts (1:100):** 3 days at room temperature (15–30 °C), 7 days at 2–8 °C or 7 days at -20 °C, maximum 2 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***

Dilute the supernatant of the extraction (**dilution step I**) **1:2 with wash buffer**, for example: 300 µl supernatant (dilution I) + 300 µl wash buffer = 1:2 (**dilution step II**). This results in a final dilution of **1:200**.

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

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

The  $\beta$ -defensin 2 in standards and samples is bound to an available excess of polyclonal antibodies against  $\beta$ -defensin 2, which are immobilized on the surface of the microtiter plate. After a washing step, to remove all interfering substances, the quantification of bound  $\beta$ -defensin 2 is carried out by adding a polyclonal anti  $\beta$ -defensin 2 antibody, which is horseradish peroxidase labeled. After a washing step to remove the unbound components, the peroxidase substrate tetramethylbenzidine is added. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The colour changes from blue to yellow and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour proportional to the  $\beta$ -defensin 2 concentration in the sample. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards.

### *Test procedure*

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

Take as many **microtiter strips** as needed from kit. Store unused strips covered at 2–8°C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Wash the precoated microtiter plate <b>5 x with 250 <math>\mu</math>l ELISA wash buffer</b> .
2.	Pipet <b>100 <math>\mu</math>l</b> of <b>STD</b> (standards), <b>CTRL</b> (controls) or <b>samples</b> into each well.
3.	Incubate for <b>1 hour at room temperature</b> (15–30°C), shaking on a horizontal mixer.
4.	Decant the contents of the plate and wash the cavities <b>5 x with 250 <math>\mu</math>l of washing buffer</b> solution.
5.	Add <b>100 <math>\mu</math>l diluted CONJ</b> (conjugate solution).
6.	Incubate for <b>1 hour at room temperature</b> (15–30°C), shaking on a horizontal mixer.
7.	Decant the contents of the plate and wash the cavities <b>5 x with 250 <math>\mu</math>l of washing buffer</b> solution.
8.	Add <b>100 <math>\mu</math>l of SUB</b> (TMB substrate) solution

9.	Incubate approximately for <b>10–20 minutes*</b> at <b>room temperature</b> (15–30°C) until sufficient colouring is achieved.
10.	Add <b>100 µl of STOP</b> (stop solution) and mix shortly.
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 colour change is temperature sensitive. We recommend to observe the colour change and to stop the reaction upon good differentiation.

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.

## 8. RESULTS

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

### 1. 4 parameter algorithm

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

### 2. Point-to-point calculation

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

### 3. Spline algorithm

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

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

## Stool

To obtain the  $\beta$ -defensin 2 concentration in fecal samples, multiply the estimated value by the dilution factor **200** according to the sample preparation.



## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement 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*

1 g stool is equivalent to 1 ml.

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

Based on Immundiagnostik studies of evidently healthy persons (n = 101) a mean value of 35 ng/ml stool was estimated. This value is consistent with the results published using the β-Defensin ELISA Kit of Immundiagnostik.

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

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

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### **Intra-Assay (n = 20)**

The reproducibility was calculated by measuring each of two samples 20 times by one technician within the same assay.

Sample	$\beta$ -Defensin 2 [ng/ml]	CV [%]
1	17.7	4.1
2	81.4	3.0

#### **Inter-Assay (n = 20)**

The total reproducibility was independently measured by several different technicians on 3 different days.

Sample	$\beta$ -Defensin 2 [ng/ml]	CV [%]
1	95.5	9.1
2	10.3	8.1

### *Dilution recovery*

Two samples were extracted as given in the manual and serially diluted.

Sample	Dilution	$\beta$ -Defensin 2 expected [ng/ml]	$\beta$ -Defensin 2 measured [ng/ml]
A	1:200	-	39.8
	1:400	19.9	19.8
	1:800	10.0	10.7
	1:1600	5.0	5.6
B	1:200	-	218.8
	1:400	109.4	105.7
	1:800	54.7	50.6
	1:1600	27.4	24.7

## *Analytical Sensitivity*

### **Limit of blank**

The calculated detection limit (LoB; Limit of Blank) was set as  $B_0 + 1.645 * SD$ . Standard 1 (blank) was measured 60 times. The values were estimated in relation to the concentration of the calibration curve and resulted in

- a detection limit of 0.02 ng/ml without consideration of the sample dilution factor
- a detection limit of 2 ng/ml with consideration of the sample dilution factor

### **Limit of detection**

The calculated detection limit (LoD; Limit of Detection) was set as  $LoB + 1.645 * SD$ . Standard 1 (blank) was measured 72 times. The values were estimated in relation to the concentration of the calibration curve and resulted in

- a detection limit of 0.06 ng/ml without consideration of the sample dilution factor
- a detection limit of 6 ng/ml with consideration of the sample dilution factor

## **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, 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.
- Quality control guidelines 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

### 15. PUBLICATIONS USING K 6500 ELISA KIT

1. Döll, M., Hauss, R. & Spermezan, R. Immunmodulierende Wirkung von (1-3),(1-6)-beta-D-Glucan -- gezeigt an der Neopterin- und b-Defensin-Synthese. *Naturheilpraxis* **05**, 676–681 (2005).
2. Soto, E. et al. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the am-

- niotic cavity. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine* **20**, 15–22 (2007).
3. Langhorst, J. et al. Activated innate immune system in irritable bowel syndrome? *Gut* **56**, 1325–6 (2007).
  4. Schwab, M. et al. The dietary histone deacetylase inhibitor sulforaphane induces human beta-defensin-2 in intestinal epithelial cells. *Immunology* **125**, 241–51 (2008).
  5. Schwiertz, A., Huber, H. & Rusch, K. Human beta-defensin-2 levels in healthy individuals. *The American journal of gastroenterology* **104**, 2110; author reply 2110–1 (2009).
  6. Langhorst, J. et al. Elevated human beta-defensin-2 levels indicate an activation of the innate immune system in patients with irritable bowel syndrome. *The American journal of gastroenterology* **104**, 404–10 (2009).
  7. Kapel, N. et al. Fecal beta-defensin-2 in children with inflammatory bowel diseases. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **48**, 117–20 (2009).
  8. Richter, M. et al. Influence of gestational age, cesarean section, and type of feeding on fecal human beta-defensin 2 and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **51**, 103–5 (2010).
  9. Campeotto, F. et al. Fecal expression of human  $\beta$ -defensin-2 following birth. *Neonatology* **98**, 365–9 (2010).
  10. Shirin, T. et al. Antimicrobial peptides in the duodenum at the acute and convalescent stages in patients with diarrhea due to *Vibrio cholerae* O1 or enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **13**, 1111–20 (2011).
  11. Kabeerdoss, J. et al. Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12<sup>®</sup> on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition journal* **10**, 138 (2011).
  12. Savilahti, E. M. et al. Intestinal defensin secretion in infancy is associated with the emergence of sensitization and atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy* **42**, 405–11 (2012).
  13. Lahtinen, S. J. et al. Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM<sup>®</sup> modifies subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly. *Age* **34**, 133–43 (2012).
  14. Kalach, N. et al. Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow's milk allergy in toddlers. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **51**, 351–61 (2013).

**Used symbols:**

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for &lt;math&gt;\leq 10&lt;/math&gt; tests



Manufacturer



Use by



Lot number