



Instructions for Use

Zonulin (Serum) ELISA



REF EIA-5515



96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	INTENDED USE.....	2
2	INTRODUCTION.....	2
3	MATERIAL SUPPLIED.....	2
4	MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	2
5	PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	3
6	STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES.....	3
7	ASSAY PROCEDURE	3
8	RESULTS.....	5
9	LIMITATIONS.....	5
10	QUALITY CONTROL	5
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	6
12	PRECAUTIONS	7
13	TECHNICAL HINTS	7
14	GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE.....	7
1	VERWENDUNGSZWECK.....	8
2	EINLEITUNG.....	8
3	INHALT DER TESTPACKUNG	8
4	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	8
5	VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	9
6	PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG.....	9
7	TESTDURCHFÜHRUNG	9
8	ERGEBNISSE	11
9	EINSCHRÄNKUNGEN.....	11
10	QUALITÄTSKONTROLLE.....	11
11	TESTCHARAKTERISTIKA.....	12
12	VORSICHTSMASSNAHMEN.....	13
13	TECHNISCHE MERKMALE.....	13
14	ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13
15	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR.....	14
	SYMBOLS USED	15

1 INTENDED USE

This ELISA is intended for the quantitative determination of zonulin family peptides (ZFP) in serum.

For in vitro diagnostic use only.

2 INTRODUCTION

Zonulin is a human protein analogue to the zonula occludens toxin derived from *Vibrio cholerae* which regulates tight junctions 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.

Fasano and his co-workers found that the zonulin 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.

An increased intestinal permeability, also colloquially called 'leaky gut', is nowadays associated with the metabolic syndrome, obesity, and several autoimmune, inflammatory, and neoplastic diseases. Based on evidence, leaky gut plays a meaningful role in diseases such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, asthma, and inflammatory bowel diseases.

The polyclonal anti-body used in our ELISA is based on the zonulin sequence as published by Wang (Journal of Cell Science, 2000) and di Pierro (Journal of Biological Chemistry, 2001).

Correspondingly, the readings of Zonulin (Serum) ELISA detecting zonulin family peptides correlate well - as already found in many papers - with established metabolic traits linked to increased gut permeability, such as insulin resistance and obesity.

3 MATERIAL SUPPLIED

Label	Kit Components	Quantity
PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 mL
DIL	Dilution buffer, ready to use	1 x 100 mL
TRACER	Tracer concentrate, biotinylated ZFP	1 x 300 µL
CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled streptavidin	1 x 200 µL
STD	Standards (lyophilized), (see specification for concentrations)	4 x 5 vials
CTRL 1	Control (lyophilized), (see specification for range)	4 x 1 vial
CTRL 2	Control (lyophilized), (see specification for range)	4 x 1 vial
SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 mL
STOP	Stop solution, ready to use	1 x 15 mL

4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10 µL - 1000 µL single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex-Mixer
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

*DRG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥18.2 MΩ cm).

5 PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µL** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:**
The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with **ultrapure water 1:10** before use (100 mL WASHBUF + 900 mL ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASH BUF** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2 °C - 8 °C**.
Wash buffer ((1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2 °C - 8 °C for 1 month**.
- The **lyophilized standards (STD)** and **controls (CTRL)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2 °C - 8 °C**. Reconstitution details are given in the specification data sheet.
Standards and controls (reconstituted STD and CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- **Preparation of the tracer:**
The **tracer concentrate (TRACER)** has to be diluted **1:101 in dilution buffer** (e. g. 150 µl TRACER + 15 ml DIL) immediately before use.
The **TRACER** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2 °C - 8 °C**.
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 dilution buffer** (e.g. 100 µL CONJ + 10 mL DIL)
The **CONJ** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2 °C - 8 °C**.
Conjugate (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready to use.
Test reagents can be used until the expiry date (see label) when stored at **2 °C - 8 °C**.

6 STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

6.1 Sample Storage

ZFP is stable in undiluted serum for 12 months at -80 °C as well as for 8 weeks at -20 °C and for 1 day at 2 °C - 8 °C. ZFP is not stable at room temperature.

6.2 Sample preparation

Sample must be diluted immediately before starting the test (see chapter "Assay procedure").

7 ASSAY PROCEDURE

7.1 Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of ZFP in serum samples.

The assay is based on the method of competitive ELISA.

As a first preparation step, a biotinylated ZFP 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-ZFP antibodies. During the incubation, the free target antigen in the samples competes with the biotinylated ZFP tracer for the binding of the polyclonal anti-ZFP antibodies immobilised on the microtiter plate wells. The unbound components are removed by a washing step. During a second incubation step, peroxidase-labelled streptavidin, which binds to the biotinylated ZFP 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 ZFP concentration in the sample; this means, high ZFP concentration in the sample reduces the concentration of the biotinylated ZFP tracer bound to the immobilised anti-ZFP 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. ZFP, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

7.2 Test procedure

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

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

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2 °C - 8 °C. Strips are stable until 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 DRG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

7.2.1 Sample Dilution

1. Pipet each **25 µL of serum samples** in the respectively labelled reaction tubes.
2. Add **475 µL of dilution buffer** to each sample.
This results in a dilution factor of 20.

7.2.2 Preparation of standards, controls and diluted samples

3. Transfer **150 µL** of each **standard, control or diluted sample** in the correspondingly labelled reaction tubes and add **150 µL of tracer**. Vortex well and use promptly in the test.

Important:

Carry out the **addition of tracer simultaneously with standards, controls and diluted samples** in order to ensure equal treatment.

Standards, controls and samples are now ready for use in the test.

7.2.3 ELISA Procedure

4. Add each **100 µL** of the **prepared standards / controls / samples** into the respective wells.
5. Cover the strips and incubate for **1 hour shaking** on a horizontal shaker at 550 rpm with an orbit of 2 mm at room temperature (15 °C - 30 °C).
6. Discard the content of each well and wash **5 times** with **250 µL wash buffer**.
After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
7. Add **100 µL conjugate** (diluted CONJ) into each well.
8. Cover the strips and incubate for **1 hour shaking** on a horizontal shaker at 550 rpm with an orbit of 2 mm at room temperature (15 °C - 30 °C).
9. Discard the content of each well and wash **5 times** with **250 µL wash buffer**.
After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
10. Add **100 µL substrate** (SUB) into each well.
11. Incubate for **10 - 20 minutes** at room temperature (15 °C - 30 °C)* **in the dark**.
12. Add **100 µL stop solution** (STOP) into each well and mix well.
13. 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 used programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Serum samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 20** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

9 LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement 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

LoB see chapter “Performance characteristics”.

10 QUALITY CONTROL

DRG 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.

10.1 Reference range

Based on studies of serum samples of apparently healthy persons (n = 40), a median value of 34 ng/mL (± 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

11.1 Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay); n=40

The repeatability was assessed with 2 serum samples under **constant** parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [ng/mL]	CV [%]
1	43.90	3.5
2	38.38	6.0

Reproducibility (Inter-Assay); n=25

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

Sample	Mean value [ng/mL]	CV [%]
1	41.13	7.7
2	46.15	8.3

11.2 Accuracy – Trueness

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

Sample [ng/mL]	Spike [ng/mL]	Expected [ng/mL]	Obtained [ng/mL]	Recovery [%]
10.788	51.58	62.469	66.331	106.2
	37.71	48.494	50.259	103.6
	26.64	37.430	34.469	92.1
12.428	51.58	64.109	70.666	110.2
	37.71	50.134	50.883	101.5
	26.64	39.070	33.032	84.5
13.372	51.58	65.053	70.547	108.4
	37.71	51.078	53.548	104.8
	26.64	40.014	34.266	85.6

11.3 Linearity

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

For ZFP in serum, the method has been demonstrated to be linear from 3.03 – 40.25 ng/mL, showing a non-linear behaviour of less than ± 20 % in this interval for concentrations greater than the Limit of Quantitation.

Sample	Dilution	Expected [ng/mL]	Obtained [ng/mL]	Recovery [%]
A	1:20	36.69	36.69	100.00
	1:40	18.34	19.02	103.70
	1:80	9.17	9.92	108.17
	1:160	4.59	5.91	128.79
B	1:20	40.25	40.25	100.00
	1:40	20.13	20.41	101.41
	1:80	10.06	10.90	108.29
	1:160	5.03	5.64	112.09
	1:320	2.52	3.03	120.52

11.4 Analytical Sensitivity

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard without considering possibly used sample dilution factors

Limit of blank, LoB	0.140 ng/mL
Limit of detection, LoD	0.183 ng/mL
Limit of quantitation, LoQ	0.183 ng/mL

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

11.5 Analytical specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against human haptoglobin. There was no cross-reactivity observed.

Substance tested	Concentration added	Concentration obtained	Conclusion
Human haptoglobin	2.9 mg/mL	< 0.02 ng/mL	< LoB

12 PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for in vitro diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.



Warning: Causes serious eye irritation

IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13 TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14 GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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. DRG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.

1 VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Zonulin-Familien-Peptiden (ZFP) 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-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.

Eine erhöhte Darmpermeabilität, die auch unter dem Begriff „*Leaky Gut Syndrom*“ bekannt ist, wird heutzutage mit dem metabolischen Syndrom, Fettleibigkeit und verschiedenen Autoimmun-, Entzündungs- und Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht. Außerdem spielt die erhöhte Darmpermeabilität auch bei Krankheiten wie Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Asthma und entzündlichen Darmerkrankungen eine bedeutende Rolle.

Der in diesem ELISA verwendete polyklonale Antikörper basiert auf der Zonulinsequenz, die von Wang (Journal of Cell Science, 2000) und di Pierro (Journal of Biological Chemistry, 2001) publiziert wurde.

Die Messwerte des Zonulin (Serum) ELISA, der Zonulin-Familien-Peptide nachweist, korrelieren – wie bereits in vielen Veröffentlichungen festgestellt – mit etablierten metabolischen Merkmalen, die mit einer erhöhten Darmpermeabilität wie Insulinresistenz und Adipositas zusammenhängen.

3 INHALT DER TESTPACKUNG

Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
PLATE	Mikrotitermodul, beschichtet	12 x 8 Vertiefungen
WASHBUF	Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 mL
DIL	Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 100 mL
TRACER	Tracerkonzentrat, biotinyliertes ZFP	1 x 300 µL
CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidasemarkiertes Streptavidin	1 x 200 µL
STD	Standards (lyophilisiert), (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	4 x 5 Fläschchen
CTRL 1	Kontrolle (lyophilisiert), (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 Fläschchen
CTRL 2	Kontrolle (lyophilisiert), (Bereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 Fläschchen
SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 mL
STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 mL

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 (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

*DRG 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 MΩcm).

5 VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien, wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x, je nach Probenaufkommen, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µL** sollten vor Gebrauch 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 im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. **WASHBUF**, bei **2 °C - 8 °C** gelagert, kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2 °C - 8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **lyophilisierten Standards (STD)** und **Kontrollen (CTRL)** sind, bei **2 °C - 8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.
Die Rekonstitutionsvorgaben für STD und CTRL sind dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen.
Standards und Kontrollen (rekonstituierte STD und CTRL) sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.
- **Vorbereitung des Tracers:**
Das **Tracer-Konzentrat (TRACER)** wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101 in Verdünnungspuffer (DIL)** verdünnt (z. B. 150 µl TRACER + 15 ml DIL).
TRACER ist, bei **2 °C - 8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.
Tracer (1:101 verdünntes TRACER) ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.
- **Vorbereitung des Konjugats:**
Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101** in Verdünnungspuffer (DIL) verdünnt (z.B. 100 µL CONJ + 10 mL DIL).
Das **CONJ** ist, bei **2 °C - 8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.
Konjugat (1:101 verdünntes CONJ) ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2 °C - 8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6 PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

6.1 Probenlagerung

ZFP ist in unverdünntem Serum für 12 Monate bei -80 °C sowie für 8 Wochen bei -20 °C und für einen Tag bei 2 °C - 8 °C stabil. Bei Raumtemperatur ist ZFP nicht stabil.

6.2 Probenvorbereitung

Die Probenverdünnung erfolgt unmittelbar vor dem Testansatz (siehe Kap. „Testdurchführung“).

7 TESTDURCHFÜHRUNG

7.1 Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von ZFP im Serum.

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven ELISA. Die zu untersuchenden Proben, Standards und Kontrollen werden mit einem biotinylierten ZFP-Tracer versetzt und anschließend in einer mit einem polyklonalen anti-ZFP-Antikörper beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das freie Zielantigen in den Proben mit dem biotinylierten ZFP-Tracer um die Bindung der polyklonalen anti-ZFP-Antikörper. Beim zweiten Inkubationsschritt wird peroxidasemarkiertes Streptavidin zugegeben, das an den biotinylierten ZFP-Tracer bindet. Nach einem Waschschritt 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 ZFP-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration des an den anti-ZFP-Antikörper gebundenen biotinylierten ZFP-Tracers und das Signal nimmt ab.

Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

7.2 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 Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automatenpezifische 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 DRG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

7.2.1 Probenverdünnung

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

7.2.2 Vorbereitung der Standards, Kontrollen und Proben

3. Je **150 µL Standard, Kontrolle bzw. verdünnte Probe** in entsprechend beschriftete Reaktionsgefäße pipettieren und mit **150 µL Tracer** versetzen. Gut vortexen und zeitnah im Test einsetzen.

Wichtig: Führen Sie die Zugabe des **Tracers bei den Standards und Kontrollen gleichzeitig mit verdünnten Proben** durch, um deren Gleichbehandlung sicherzustellen.

Standards, Kontrollen und Proben sind nun bereit für den Einsatz im Test.

7.2.3 ELISA-Prozedur

4. **100 µL der vorbereiteten Standards/Kontrollen/Proben** in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
5. Streifen abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15 °C - 30 °C) **unter Schütteln bei 550 Upm mit einem Orbit von 2 mm** inkubieren.
6. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5 x mit je 250 µL Waschpuffer** waschen.
Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7. **100 µL Konjugat** (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
8. Streifen abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15 °C - 30 °C) **unter Schütteln bei 550 Upm mit einem Orbit von 2 mm** inkubieren.
9. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5 x mit je 250 µL Waschpuffer** waschen.
Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
10. **100 µL Substrat** (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
11. **10 - 20 Minuten** bei Raumtemperatur (15 °C - 30 °C) **im Dunkeln** inkubieren*
12. **100 µL Stopplösung** (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
13. **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) messen 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 von 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z. B. 0,01).

2. *Punkt-zu-Punkt-Auswertung*

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

3. *Gewichtete Spline-Funktion*

Für die optische Dichte 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

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 20** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

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

9 EINSCHRÄNKUNGEN

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

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

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

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

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

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

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

10 QUALITÄTSKONTROLLE

DRG 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 DRG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

10.1 Referenzwerte

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

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

Für Plasmaproben sind eigene Referenzbereiche zu erheben.

11 TESTCHARAKTERISTIKA

11.1 Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n=40

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/mL]	VK [%]
1	43,90	3,5
2	38,38	6,0

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=25

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

Probe	Mittelwert [ng/mL]	VK [%]
1	41,13	7,7
2	46,15	8,3

11.2 Genauigkeit – Richtigkeit

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

Probe [ng/mL]	Spike [ng/mL]	Erwartet [ng/mL]	Gemessen [ng/mL]	Wiederfindung [%]
10,788	51,58	62,469	66,331	106,2
	37,71	48,494	50,259	103,6
	26,64	37,430	34,469	92,1
12,428	51,58	64,109	70,666	110,2
	37,71	50,134	50,883	101,5
	26,64	39,070	33,032	84,5
13,372	51,58	65,053	70,547	108,4
	37,71	51,078	53,548	104,8
	26,64	40,014	34,266	85,6

11.3 Linearität

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

Für ZFP in Serum wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 3,03 bis 40,25 ng/ ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als ± 20 %.

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/mL]	Gemessen [ng/mL]	Wiederfindung [%]
A	1:20	36,69	36,69	100,00
	1:40	18,34	19,02	103,70
	1:80	9,17	9,92	108,17
	1:160	4,59	5,91	128,79
B	1:20	40,25	40,25	100,00
	1:40	20,13	20,41	101,41
	1:80	10,06	10,90	108,29
	1:160	5,03	5,64	112,09
	1:320	2,52	3,03	120,52

11.4 Analytische Sensitivität

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

Leerwert (limit of blank, LoB) 0,140 ng/mL

Nachweisgrenze (limit of detection, LoD) 0,183 ng/mL

Bestimmungsgrenze (limit of quantitation, LoQ) 0,183 ng/mL

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

11.5 Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu humanem Haptoglobin. Es wurde keine Kreuzreaktivität nachgewiesen.

Getestete Substanz	Eingesetzte Konzentration	Gefundene Konzentration	Fazit
Humanes Haptoglobin	2,9 mg/mL	< 0,02 ng/mL	< LoB

12 VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur in-vitro-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.



Achtung: Verursacht schwere Augenreizung.

BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

13 TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- 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.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettivolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma DRG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

15 REFERENCES / LITERATURE / 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.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Estable hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité