



## Arbeitsanleitung

# Anti-21-Hydroxylase - Assay


M. Addison, autoimmune polyglanduläre Syndrome Typ I/II

## 125I-Radioassay für die quantitative Bestimmung von Antikörpern gegen die 21-Hydroxylase in Serum



REF RA007/50

 50

 2 – 8 °C

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH  
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Telefon: 040/ 555 87 10 • Fax: 040/ 555 87 111  
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • E-Mail: [contact@dld-diagnostika.de](mailto:contact@dld-diagnostika.de)

## Inhaltsverzeichnis

|   |       |    |
|---|-------|----|
| 1. Testprinzip                            | Seite | 3  |
| 2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen        | Seite | 3  |
| 3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien | Seite | 4  |
| 4. Inhalt des Testbestecks                | Seite | 4  |
| 5. Probengewinnung und Aufbewahrung       | Seite | 5  |
| 6. Probenvorbereitung                     | Seite | 5  |
| 7. Testdurchführung                       | Seite | 6  |
| 8. Testauswertung                         | Seite | 7  |
| 9. Typisches Beispiel                     | Seite | 7  |
| 10. Referenzbereich                       | Seite | 8  |
| 11. Reproduzierbarkeit                    | Seite | 10 |
| 12. Literatur                             | Seite | 10 |
| Pipettierschema                           | Seite | 12 |

## 1. Testprinzip

Im Test wird  $^{125}\text{I}$ -markierte rekombinante humane 21-Hydroxylase eingesetzt. Das markierte Enzym wird mit Standards und Patientenseren inkubiert. Dabei binden die vorhandenen Antikörper an das Protein. Im zweiten Schritt werden die gebildeten Immunkomplexe mit Hilfe von Protein A ausgefällt. Nach Zentrifugation wird die Radioaktivität im Niederschlag gemessen. Die Menge an Radioaktivität ist direkt proportional zur Menge der vorhandenen Antikörper. Über die Standardkurve kann die Konzentration der Antikörper in den Patientenproben in U/ml abgelesen werden.

## 2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.
- Die angegebenen Verfallsdaten sind unbedingt zu beachten.
- Einige der Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. Verschlucken und Berühren mit der Haut vermeiden.
- Für den Umgang mit radioaktiven Stoffen gelten die Vorschriften der Strahlenschutzverordnung .
- Folgende Vorsichtsmaßnahmen sind unbedingt einzuhalten:  
Beim Umgang mit radioaktiven Stoffen nicht essen, trinken und rauchen. Radioaktives Material niemals mit dem Mund pipettieren.  
Einmalhandschuhe verwenden. Verschüttetes radioaktives Material sofort aufwischen, kontaminierte Flächen oder Gegenstände mit geeigneten Detergenzien reinigen.
- Fester und flüssiger Abfall sind gemäß StrSchV zu behandeln.
- Radioaktive Reagenzien dürfen nur an Personen abgegeben werden, die im Besitz einer gültigen Umgangsgenehmigung sind.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg, HCV bzw. HIV I/II-Antikörper ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

### 3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien siehe Vorbereitung der Reagenzien. Direkte Sonneneinstrahlung ist zu vermeiden. Das Verfallsdatum sowie die Chargenbezeichnung sind auf jedem Fläschchen bzw. Kit angegeben. Bei größeren Ansätzen möglichst nur Reagenzien einer Charge verwenden.

### 4. Inhalt des Testbestecks

- 4.1 **Tracer** **TRACER** 2 Fläschchen  
125I- markierte 21-Hydroxylase  
Lyophilisat, Aktivität < 25 kBq pro Fläschchen
- 4.2 **Protein A** **PROTEIN A** 1 Fläschchen  
Lyophilisat
- 4.3 **Assaypuffer** **BUFFER** 1 Flasche  
120 ml, gebrauchsfertig
- 4.4 **Standards** **CAL A** – **CAL F** 6 Fläschchen  
je 0,15 ml, gebrauchsfertig  
Konzentrationen:
- | Standard | A | B | C | D  | E   | F     |
|----------|---|---|---|----|-----|-------|
| U/ml     | 0 | 1 | 5 | 50 | 500 | 5.000 |
- 4.5 **Kontrolle 1 und 2** **CON 1** – **CON 2** 2 Fläschchen  
je 0,15 ml, gebrauchsfertig,  
enthält Humanserum  
Konzentrationsbereiche siehe QC-Zertifikat

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20 µl, 50 µl und 1 ml Pipetten
- Multipette mit Aufsätzen für verschiedene Volumina
- Polystyrol-Spitzboden oder Rundbögen-Röhrchen
- Zentrifuge (möglichst mit Kühlung) mit mind. 3500 x g
- Absaugvorrichtung oder Dekantiervorrichtung
- Vortex-Mischer
- Gamma-Counter

## 5. Probengewinnung und Aufbewahrung

Für den Test sollte Serum eingesetzt werden. Hämolytische bzw. lipämische Proben sollten nicht verwendet werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben vermeiden. Proben, die eine Trübung zeigen, sollten vor dem Test zentrifugiert werden.

Die Proben können bis zu einer Woche bei 2 - 8 °C im Kühlschrank oder eingefroren bei -20 °C für einen längeren Zeitraum gelagert werden.

## 6. Vorbereitung der Proben und Reagenzien

### 6.1 Patientenproben

Vor dem Test sollen die Proben auf Raumtemperatur gebracht und durchmischt werden. Es empfiehlt sich, eingefrorene Proben nach dem Auftauen kurz zu zentrifugieren, um eventuelle Schwebeteilchen zu entfernen.

### 6.2 Tracer **TRACER**

Vor Gebrauch wird der lyophilisierte Tracer mit je 1,3 ml Assaypuffer (4.3) aufgelöst. Das Fläschchen wird anschließend leicht geschwenkt, bis sich eine homogene Lösung gebildet hat.

Der aufgelöste Tracer sollte noch am gleichen Tag verwendet werden. Bei einer Lagerung bei 2-8 °C verliert der aufgelöste Tracer nach wenigen Tagen an Bindung. Der aufgelöste Tracer darf nicht eingefroren werden!

### 6.2 Protein A **PROTEIN A**

Vor Gebrauch wird das lyophilisierte Protein A mit 2,6 ml Assaypuffer (4.3) aufgelöst. Das Fläschchen wird anschließend leicht geschwenkt, bis sich eine homogene Suspension gebildet hat.

Unmittelbar vor dem Pipettieren muß der Inhalt des Fläschchens gut gemischt werden, um eine homogene Suspension zu erhalten.

Bei 2-8 °C gelagert ist die Suspension des Protein A bis zum Verfallsdatum des Kits stabil. Die aufgelöste Suspension darf nicht eingefroren werden!



## 7. Testdurchführung

- 7.1 Je 20  $\mu$ l Standards, Kontrollen und Patientenseren in die entsprechend beschrifteten Röhren (in Doppelbestimmung) pipettieren.
- 7.2 Je 50  $\mu$ l aufgelösten Tracer in alle Röhren pipettieren.
- 7.3 Röhren auf einem Vortex sorgfältig mischen und 16 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2-8 °C inkubieren.
- 7.4 Je 50  $\mu$ l Protein A in alle Röhren (außer für Totalaktivität) pipettieren. Protein A-Suspension vor dem Pipettieren gut mischen!
- 7.5 Röhren auf einem Vortex sorgfältig mischen und 1 Stunde bei 2-8 °C inkubieren.
- 7.6 Je 1 ml **kalten** (2-8 °C) Assaypuffer (4.3.) in alle Röhren (außer für Totalaktivität) pipettieren.
- 7.7 Röhren sorgfältig mischen und anschließend 20 bis 30 Minuten bei ca. 3.500 x g (möglichst unter Kühlung) zentrifugieren.
- 7.8 Überstand aus allen Röhren (außer Totalaktivität) vorsichtig absaugen oder dekantieren.
- 7.9 Röhren (inkl. Röhren für die Bestimmung der Totalaktivität) 1 Minute im Gamma-Counter messen.

## 8. Testauswertung

Die Erstellung der Standardkurve und die Berechnung der Konzentration der Proben erfolgt mit einem IRMA-Programm.

Die gemittelten cpm der Standards (y-Achse, logarithmisch) werden gegen deren jeweilige Konzentration (x-Achse, logarithmisch) in einem Diagramm auftragen. Alternativ können die cpm der einzelnen Standards (B) auf die cpm der Totalaktivität (T) bezogen werden und als % B/T auf der y-Achse gegen Konzentration der Standards auf der x-Achse aufgetragen werden.

Die Konzentrationen der Proben können dann direkt von der Standardkurve über ihre jeweiligen cpm bzw. % B/T abgelesen werden.

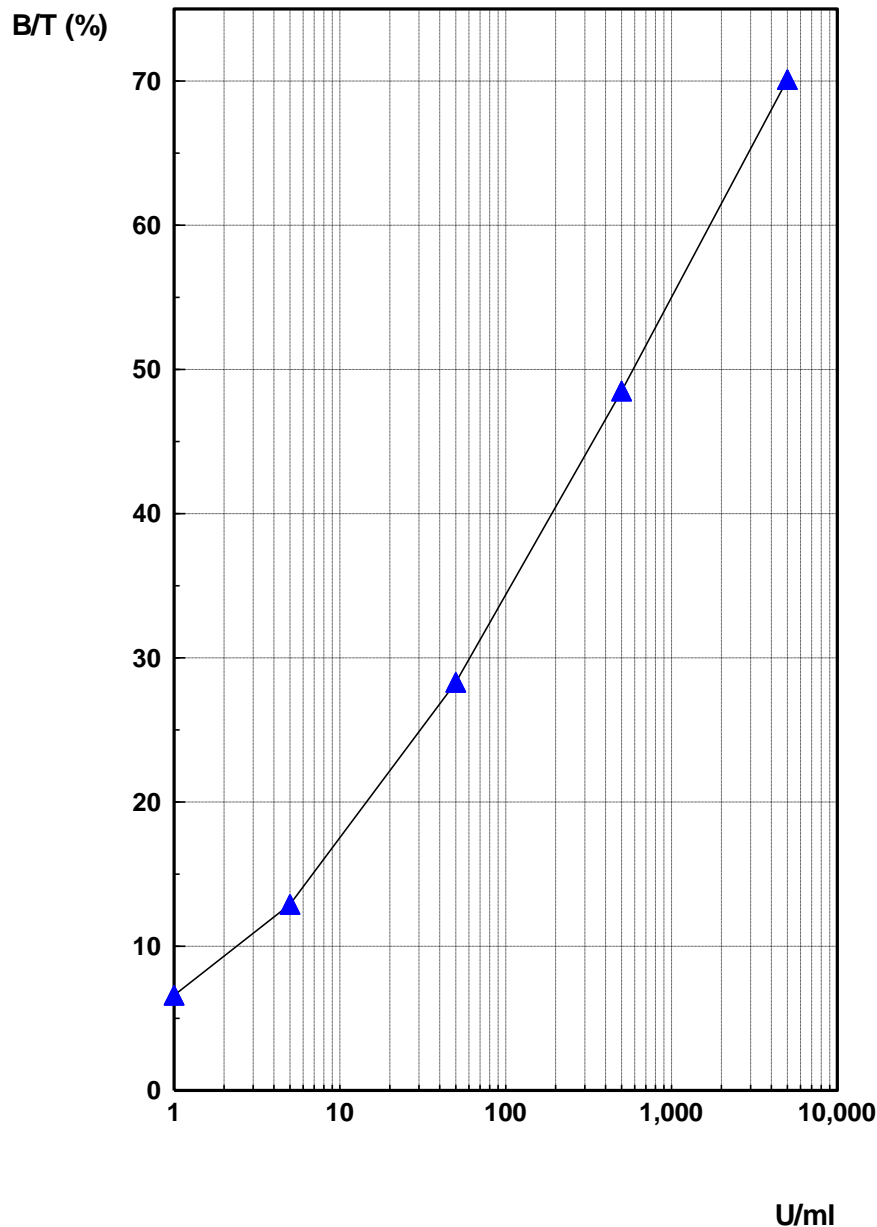
## 9. Typisches Beispiel

Nachfolgend ist ein typisches Beispiel einer Standardkurve aufgeführt.

| Konzentrationen (U/ml) | cpm1   | cpm2   | Mittelwert | B/T (%) |
|------------------------|--------|--------|------------|---------|
| Totalaktivität         | 32.847 | 32.968 | 32.908     |         |
| 0                      | 1.027  | 1.109  | 1.068      | 3,2     |
| 1                      | 2.253  | 2.099  | 2.176      | 6,6     |
| 5                      | 4.319  | 4.203  | 4.261      | 12,9    |
| 50                     | 9.201  | 9.397  | 9.299      | 28,3    |
| 500                    | 15.744 | 16.193 | 15.969     | 48,5    |
| 5.000                  | 23.263 | 22.858 | 23.061     | 70,1    |

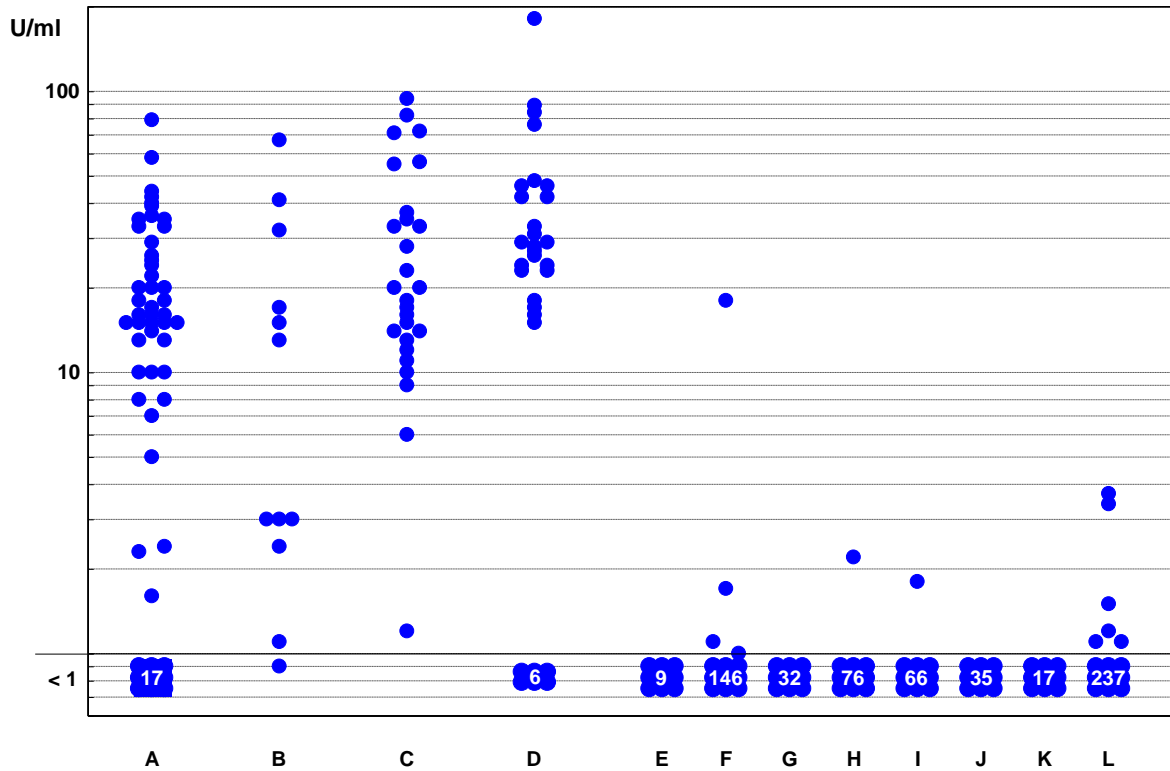
Auf der nächsten Seite ist die entsprechende Standardkurve abgebildet.

## Typische Standardkurve



### 10. Referenzbereich

Zur Ermittlung des Referenzbereichs wurden 243 Proben von Normalpersonen gemessen. Der Mittelwert dieser Proben lag bei 0,08 U/ml mit einer Standardabweichung von 0,36 U/ml. Daraus kann eine obere Grenze des Referenzbereichs von ca. 1 U/ml angenommen werden. Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität wurden außerdem Proben von verschiedenen Patientengruppen gemessen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



|          |   |         |
|----------|---|---------|
| Gruppe A | Isolierter M. Addison                           | N = 60  |
| Gruppe B | Polyglanduläres Autoimmunsyndrom Typ I          | N = 12  |
| Gruppe C | Polyglanduläres Autoimmunsyndrom Typ II         | N = 27  |
| Gruppe D | Immunfluoreszenz positiv                        | N = 30  |
| Gruppe E | Tbc-bedingter Addison                           | N = 9   |
| Gruppe F | Insulinabhängiger Diabetes mellitus IDDM        | N = 150 |
| Gruppe G | Nicht Insulinabhängiger Diabetes mellitus NIDDM | N = 32  |
| Gruppe H | Morbus Basedow                                  | N = 77  |
| Gruppe I | Hashimoto Thyreoiditis                          | N = 67  |
| Gruppe J | Myasthenia gravis                               | N = 35  |
| Gruppe K | Vorzeitiges Ovarialversagen                     | N = 17  |
| Gruppe L | Gesunde Blutspender                             | N = 243 |

Aus diesen Messungen ergeben sich folgende Daten:

Referenzbereich < 1 U/ml

Sensitivität

isolierter M. Addison (Gruppe A) 72 %

APS Typ I/II (Gruppen B - C) 97 %

Spezifität (Gruppen E - L) 98 %

## 11. Reproduzierbarkeit

Folgende intra- und inter-Assay-Variationskoeffizienten wurden ermittelt:

| intra-Assay Variation (n=20) |           |        |
|------------------------------|-----------|--------|
| Probe                        | MW (U/ml) | VK (%) |
| 3                            | 17,4      | 5,1    |
| 4                            | 5,7       | 5,6    |

| inter-Assay-Variation (n=25) |           |        |
|------------------------------|-----------|--------|
| Probe                        | MW (U/ml) | VK (%) |
| 1                            | 7,5       | 6,6    |
| 2                            | 22,4      | 5,9    |

## 12. Literatur

- G.H. Williams, R.G. Dluhy (dtsch. von M. Berger). (1995)  
**Primäre Nebennierenrindeninsuffizienz (Morbus Addison)**  
in Harrisons, Innere Medizin 2, Dt. Ausg., 13. Auflage/hrsg. von K.J.G. Schmailzl  
Blackwell Wiss.-Verlag, Seite 2303-2306
- W. Oelkers, S. Diederich, V. Bähr (1994)  
**Diagnostik der Nebennierenrindeninsuffizienz**  
Dtsch. med. Wschr. **119**, 555-559
- D. Siebenlist (1995)  
**"Weißer Morbus Addison" als intensivmedizinischer Notfall**  
Leser-Zuschrift in Dtsch. med. Wschr. **120**, 346-347
- W. Oelkers (1996)  
**Review Article: Adrenal Insufficiency**  
N. Engl. J. Med. **335**: 1206-1212
- S. Martin, F.A. Gries, H. Hauner (1994)  
**Kasuistik** (Typ-I-Diabetes mellitus mit M. Addison nach 20 Jahren)  
Internist **35**: 568-571
- G. Kahaly, G. Förster, E. Otto, C. Hansen, G. Schulz (1997)  
**Diabetes mellitus Typ I als Teil des polyglandulären Autoimmunsyndroms**  
Diab. Stoffw. **6**: 19-27
- C. Betterle, M. Volpato, B. Rees Smith, J. Furmaniak, S. Chen, N.A. Greggio, M. Sanzari, F. Tedesco, B. Pedini, M. Boscaro, F. Presotto (1997)  
**I. Adrenal cortex and steroid 21-hydroxylase autoantibodies in adult patients with organ-specific autoimmune diseases: markers of low progression to clinical Addison's disease**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. **82**: 932-938

- C. Betterle, M. Volpato, B. Rees Smith, J. Furmaniak, S. Chen, R. Zanchetta, N.A. Greggio, B. Pedini, M. Boscaro, F. Presotto (1997)  
**II. Adrenal cortex and steroid 21-hydroxylase autoantibodies in children with organ-specific autoimmune diseases: markers of high progression to clinical Addison's disease**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. **82**: 939-942
- H. Tanaka, M.S. Perez, M. Powell, J.F. Sanders, J. Sawicka, S. Chen, L. Prentice, T. Asawa, C. Betterle, M. Volpato, B. Rees Smith, J. Furmaniak (1997)  
**Steroid 21-Hydroxylase Autoantibodies: measurements with a new immunoprecipitation assay**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. **82**:
- S. Chen, J. Sawicka, C. Betterle, M. Powell, L. Prentice, M. Volpato, B. Rees Smith, J. Furmaniak (1996)  
**Autoantibodies to steroidogenic enzymes in autoimmune polyglandular syndrome, Addison's disease, and premature ovarian failure**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. **81**: 1871-1876
- J. Furmaniak , B. Rees Smith (1995)  
**Editorial: Adrenal and Gonadal Autoimmune Diseases**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. **80**: 1502-1505
- A. Falorni, a. Nikoshkov, S. Laureti, E. Grenbäck, A-L. Hulting, G. Casucci, F. Santeusano, P. Brunetti, H. Luthman, A. Lernmark (1995)  
**High diagnostic accuracy for idiopathic Addison's Disease with a sensitive radiobinding assay for autoantibodies against recombinant human 21-Hydroxylase**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. **80**: 2752-2755
- G. Coco et al. (2006)  
**Estimated Risk for Developing Autoimmune Addison's Disease in Patients with Adrenal Cortex Autoantibodies**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. **91**: 1637-1645

Further literature available upon request

Weitere Literatur auf Anfrage

## Pipettierschema

|                               | T | B0 | Standards | Kontrollen | Patienten |
|-------------------------------|---|----|-----------|------------|-----------|
| Standard A $\mu\text{l}$      |   | 20 |           |            |           |
| Standard B-F $\mu\text{l}$    |   |    | 20        |            |           |
| Kontrolle 1 & 2 $\mu\text{l}$ |   |    |           | 20         |           |
| Patientenprobe $\mu\text{l}$  |   |    |           |            | 20        |

|  |    |    |    |    |    |
|--|----|----|----|----|----|
| $^{125}\text{I}$ -Tracer $\mu\text{l}$ | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
|--|----|----|----|----|----|

Sorgfältig mischen (Vortex) und 16 - 20 Stunden (über Nacht)  
bei 2 - 8 °C inkubieren

|                         |  |    |    |    |    |
|-------------------------|--|----|----|----|----|
| Protein A $\mu\text{l}$ |  | 50 | 50 | 50 | 50 |
|-------------------------|--|----|----|----|----|

Sorgfältig mischen (Vortex) und 1 Stunde bei 2 - 8 °C inkubieren

|                   |  |   |   |   |   |
|-------------------|--|---|---|---|---|
| Assaypuffer    ml |  | 1 | 1 | 1 | 1 |
|-------------------|--|---|---|---|---|

20 - 30 Minuten (unter Kühlung) bei mindestens 3.500 x g zentrifugieren

Überstand absaugen oder vorsichtig dekantieren (außer T)

Röhrchen 1 Minute im Gamma-Counter messen