

**Zinc Transporter 8 (ZnT8)  
Autoantibody ELISA Kit -  
Gebrauchsanweisung****RSR Limited**Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff  
CF14 5DU United Kingdom

Tel.: +44 29 2068 9299

Fax: +44 29 2075 7770

Email: [info@rsrltd.com](mailto:info@rsrltd.com)Website: [www.rsrltd.com](http://www.rsrltd.com)Advena Ltd. Tower Business Centre, 2<sup>nd</sup> Fl.,  
Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta.**ZWECKBESTIMMUNG**

Das RSR ZnT8 Autoantibody (ZnT8 Ab) ELISA Kit ist zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern gegen ZnT8 (ZnT8-Ak) in Humanserum und nur für die Verwendung durch Fachpersonal bestimmt. Autoantikörper gegen Pankreas-Beta-Zell-Antigene sind wichtige serologische Marker des Typ-1-Diabetes mellitus (Typ-1-DM). Zu den von diesen Antikörpern erkannten Antigenen gehören Insulin, Glutaminsäure-decarboxylase (GAD<sub>65</sub> kDa-Isoform), das Inselzellantigen IA-2 oder ICA-512 und der Zinktransporter 8 (ZnT8). ZnT8-Ak sind hauptsächlich auf die C-terminale Domäne von ZnT8 gerichtet (Aminosäurereste 268-369). Der Genpolymorphismus der menschlichen Population am Codon für die 325. Aminosäure führt zur Expression von drei Proteinvarianten: Arginin (R) 325, Tryptophan (W) 325 und sehr selten Glutamin (Q) 325. ZnT8-Ak können spezifisch sein für R 325 oder die W 325-Variante, oder unspezifisch sein für den Aminosäurerest-325. Seren, die nur mit dem Q-Allel reagieren, sind extrem selten. Der ZnT8-Ab-ELISA von RSR kann Autoantikörper nachweisen und quantifizieren, die für R 325 oder W 325 spezifisch sind oder für Aminosäurerest-325-Varianten unspezifisch sind.

**LITERATURLISTE**

J. M. Wenzlau et al

"The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type I diabetes." PNAS 2007 104:17040-17045

P. Achenbach et al

"Autoantibodies to zinc transporter 8 and *SLC30A8* genotype stratify type 1 diabetes risk." Diabetologia 2009 52:1881-1888

J. M. Wenzlau et al

"Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects." J Clin Endocrinol Metab 2010 95:4712 - 4719

L. Petruzelkova et al

"The dynamic changes of zinc transporter 8 autoantibodies in Czech children for the onset of type 1 diabetes mellitus." Diabet Med 2014 31:165 - 71

G. Dunseath et al

"Bridging-type enzyme-linked immunoassay for zinc transporter 8 autoantibody measurements in adult patients with diabetes mellitus." Clin. Chim. Acta. 2015 447:90 - 95

**PATENTE**

Es gelten folgende Patente:

Europäische Patente EP 1 563 071 B1 und EP 2 118 309 B1, US-Patente US 7,851,164 B2 und US 9,023,984 B2, chinesische Patente CN 1738900 B und ZL 200780051859.3, indisches Patent 279741 und japanische Patente 4498144 und 5694668.

**TESTPRINZIP**












Im ZnT8 Ab ELISA von RSR binden ZnT8-Ak in Patientenseren, Kalibratoren und Kontrollen an dem in den ELISA-Plattenvertiefungen beschichteten ZnT8. Nach einer 16 bis 20-stündigen Inkubation werden die Überstände verworfen, wobei an das ZnT8 gebundene ZnT8-Ak zurückbleiben. ZnT8-Biotin wird in einem 2. Inkubationsschritt zugegeben. Die ZnT8-Ak in den Proben binden als Brücke bivalent (oder polyvalent) das ZnT8-Biotin an das in der Vertiefung beschichtete ZnT8. Ungebundenes ZnT8-Biotin wird dann in einem Waschschritt entfernt und die Menge an gebundenem ZnT8-Biotin (in einem 3. Inkubationsschritt) durch Zugabe von Streptavidin-Peroxidase (SA-POD), die spezifisch an Biotin bindet, bestimmt. Überschüssiges, ungebundenes SA-POD wird dann gewaschen und die Zugabe des Peroxidase-Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) resultiert in der Bildung einer blauen Farbe. Diese Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung gestoppt, wobei der Inhalt der Vertiefung gelb wird. Die Extinktion der gelben Reaktionsmischung bei 405 nm und 450 nm wird dann unter Verwendung eines ELISA-Plattenlesegeräts gemessen. Eine höhere Extinktion zeigt das Vorhandensein von ZnT8-Ak in der Testprobe an. Das Ablesen bei 405 nm ermöglicht die Quantifizierung hoher Extinktionen und sollte verwendet werden, wenn die OD bei 450 nm größer ist als 3,0. Wenn bei nur einer Wellenlänge gemessen werden kann, können 405 nm verwendet werden. Das Messintervall beträgt 15 – 2000 E/mL (E = beliebige RSR-Einheiten).

**AUFBEWAHRUNG UND VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN**

Zu analysierende Seren sollten bald nach dem Abseren getestet oder, vorzugsweise in Aliquots, bei ≤ -20°C gelagert werden. 50 µL sind ausreichend für ein Assay (Doppelbestimmungen mit je 25 µL). Wiederholtes Einfrieren, Auftauen oder Erhöhungen in der Lagertemperatur sollten vermieden werden. Lipämische oder hämolytische Seren sollten nicht verwendet werden. Citrat- und Heparinplasma können in dem Assay verwendet werden. Studien zeigten, dass bei EDTA-Plasmaproben, die mit ZnT8-Ak-positiven Seren gespikkt wurden im Vergleich zu gespiktem Serum desselben Spenders niedrigere Signale beobachtet werden konnten. Insbesondere betrogen die OD<sub>450</sub>-Werte mit gespiktem EDTA-Plasma nur 33% - 65% des gespikten Serums bzw. 37% - 64% in Bezug auf E/mL (19 Proben mit gespikten Serumkonzentrationen im Bereich von 11 E/mL -

326 E/mL). Falls erforderlich, Testseren bei Raumtemperatur auftauen lassen und vorsichtig mischen, um ihre Homogenität zu gewährleisten. Die Seren vor dem Assay zentrifugieren (vorzugsweise für 5 min bei 10-15.000 rpm in einer Mikrozentrifuge), um Partikel zu entfernen. Lassen Sie diesen Zentrifugationsschritt bitte nicht weg, sollten die Seren trüb sein oder Partikel enthalten.

### SYMBOLLE

Symbol	Bedeutung
	Konformitätserklärung
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Gebrauchsanweisung beachten
	Hersteller
	Inhalt ausreichend für X Bestimmungen
	Ungeöffnet verwendbar bis
	Begrenzung der Lagertemperatur
	Negative Control
	Positive Control

### ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

Pipetten zu Dispensieren von 25 µL und 100 µL.  
Gefäße zum Messen verschiedener Volumina, zum Rekonstituieren oder Verdünnen der mitgelieferten Reagenzien.

Reinstwasser

ELISA-Plattenleser, geeignet für 96-Well-Formate und in der Lage, bei 450 nm und 405 nm zu messen.

ELISA-Plattenschüttler mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 rpm (kein Orbitalschüttler).

ELISA-Plattenabdeckung

### VORBEREITUNG DER MITGELIEFERTEN REAGENZIEN

Ungeöffnete Kits und alle Kitkomponenten bei 2-8 °C lagern.

<b>A</b>	<p><b>ZnT8 Coated Wells</b> 12 teilbare Streifen mit je 8 Vertiefungen (insgesamt 96) in einem Rahmen und in einem Folienbeutel versiegelt. Vor dem Öffnen mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen.</p>
----------	--

	Stellen Sie sicher, dass die benötigten Vertiefungen fest in den mitgelieferten Rahmen eingepasst sind. Nach dem Öffnen unbenötigte Vertiefungen wieder in den mitgelieferten Original-Folienbeutel mit Trockenmittel geben und mit Klebeband verschließen. Den Folienbeutel in den mitgelieferten selbstverschließenden Plastikbeutel legen und bis zu 3 Monate bei 2-8°C lagern.
<b>B1-5</b>	<p><b>Calibrators</b> 10, 20, 75, 500, 2000 u/mL (=E/mL, willkürlich festgelegte RSR Einheiten) 5 x 0,7 mL Gebrauchsfertig</p>
<b>C1-2</b>	<p><b>Positive Controls I &amp; II</b> (Siehe Etikett für Konzentrationsbereich) 2 x 0,7 mL Gebrauchsfertig</p>
<b>D</b>	<p><b>Negative Control</b> 0,7 mL Gebrauchsfertig</p>
<b>E</b>	<p><b>ZnT8-Biotin</b> 3 Fläschchen Lyophilisiert</p> <p>Jedes Fläschchen mit 5,5 mL Reconstitution Buffer for ZnT8-Biotin (F) rekonstituieren. Wenn mehr als ein Fläschchen verwendet wird, die Fläschchen poolen und vor Gebrauch vorsichtig mischen. Nach der Rekonstitution bei 2-8°C bis zu 3 Tage lagerbar.</p>
<b>F</b>	<p><b>Reconstitution Buffer for ZnT8-Biotin</b> 2 x 15 mL, rot gefärbt Gebrauchsfertig</p>
<b>G</b>	<p><b>Streptavidin Peroxidase (SA-POD)</b> 0,7 mL Konzentrat</p> <p>Vor Gebrauch 1:20 mit Diluent for SA-POD (H) verdünnen. Zum Beispiel 0,5 mL (G) + 9,5 mL (H). Nach dem Verdünnen bis zu 16 Wochen bei 2-8°C lagerbar.</p>
<b>H</b>	<p><b>Diluent for SA-POD</b> 15 mL Gebrauchsfertig</p>
<b>I</b>	<p><b>Peroxidase Substrate (TMB)</b> 15 mL Gebrauchsfertig</p>
<b>J</b>	<p><b>Concentrated Wash Solution</b> 125 mL Konzentrat</p> <p>Vor Gebrauch 10 x mit Reinstwasser verdünnen. Zum Beispiel 100 mL (J) + 900 mL Reinstwasser. Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum des Kits lagerbar.</p>
<b>K</b>	<p><b>Stop Solution</b> 12 mL Gebrauchsfertig</p>

### TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien mit Ausnahme von ZnT8-Biotin und Reconstitution Buffer for ZnT8-Biotin am Tag der Verwendung auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen. Für die Schritte 4, 7, 10 und 11 wird ein Mehrfachdispenser (z. B. Eppendorf Multipette®) empfohlen.

Tag 1	1.	Je <b>25 µL</b> Calibrators (B1-5), Controls (C1-2 und D) und Patientenseren in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren (Doppelbestimmung wird empfohlen), dabei zwei Vertiefungen leer lassen (= Blank, siehe Schritt 12).
	2.	Die Vertiefungen abdecken, für ca. 5 Sekunden auf einem Plattenschüttler schütteln und über Nacht für 16-20 Stunden bei 2-8°C ohne Schütteln inkubieren.
Tag 2	3.	Mit einem ELISA-Plattenwascher die Vertiefungen drei Mal mit verdünnter Wash Solution (J) waschen und absaugen. Wenn kein Plattenwascher verfügbar ist, den Inhalt der Vertiefungen entleeren durch rasches Umdrehen der Vertiefungen über einem geeigneten Behälter, drei Mal manuell waschen und anschließend die Vertiefungen umgedreht auf eine saubere, trockene, saugfähige Oberfläche vorsichtig trocken Klopfen.
	4.	Je <b>100 µL kalte</b> rekonstituierte ZnT8-Biotin (E) in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren. Vermeiden Sie beim Pipettieren in die Vertiefungen ein Herausspritzen des Materials.
	5.	Die Vertiefungen abdecken und bei 2-8°C für 1 Stunde ohne Schütteln inkubieren.
	6.	Waschschritt 3 wiederholen.
	7.	Je <b>100 µL</b> verdünnter SA-POD (G) in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren.
	8.	Die Vertiefungen abdecken und bei Raumtemperatur für 20 Minuten auf einem ELISA-Plattenschüttler (500 rpm) inkubieren.
	9.	Waschschritt 3 wiederholen. Beim manuellen Waschen, abschließend einen zusätzlichen Waschschritt mit Reinstwasser durchführen (um eventuellen Schaum zu entfernen), dann erst die Vertiefungen umgedreht trocken Klopfen.
	10.	Je <b>100 µL</b> TMB (I) in jede Vertiefung (einschließlich Blank) pipettieren und im Dunkeln bei Raumtemperatur für 20 Minuten ohne Schütteln inkubieren.
	11.	Je <b>100 µL</b> Stop Solution (K) in jede Vertiefung (einschließlich Blank) pipettieren, Die Vertiefungen abdecken und für ca. 5 Sekunden auf einem Plattenschüttler schütteln. Die Dauer der Substratinkubation sollte bei allen Vertiefungen gleich lang sein.
	12.	Innerhalb von 30 Minuten die Extinktion jeder Vertiefung bei 405 nm, dann bei 450 nm mit einem ELISA-Plattenlesegeräts bestimmen, dabei bei jeder Vertiefung den Wert des Blanks abziehen(Vertiefung mit <b>nur 100 µL</b> TMB (I) und <b>100 µL</b> Stop Solution (K)).

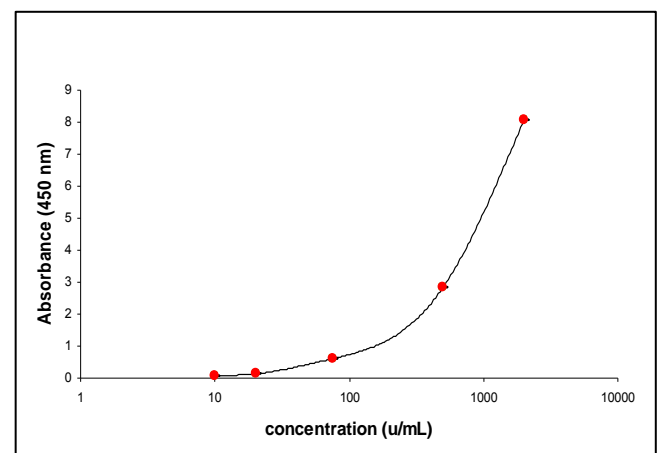
## TESTAUSWERTUNG

Eine Kalibrierkurve kann erstellt werden, indem die Konzentration der Calibrators auf der x-Achse (logarithmische Skala) gegen die Extinktion der Calibrators auf der y-Achse (lineare Skala) aufgetragen werden. Die ZnT8-Ak-Konzentrationen in Patientenseren können dann aus der Eichkurve [aufgetragen bei RSR als Spline-Log/Lin-Kurve (Glättungsfaktor = 0)] abgelesen werden. Andere Datenreduktionssysteme können verwendet werden. Die Negative Control (D) hat eine Konzentration von 0 E/mL, ihr kann jedoch ein Wert von 1 E/mL zugewiesen werden, um die Computerverarbeitung der Daten zu erleichtern. Proben mit hohen ZnT8-Ak-Konzentrationen können in der Negative Control (D) des Kits verdünnt werden. Beispiel: 15 µL Probe plus 135 µL Negative Control für eine 10-fache Verdünnung. Andere Verdünnungen (z. B. 100x) können aus einer 10x-Verdünnung oder auf andere Weise nach Bedarf hergestellt werden. Es kann vorkommen, dass einige Seren sich nicht linear verdünnen.

**TYPISCHE ERGEBNISSE (Nur als Beispiel, nicht zur Berechnung der tatsächlichen Ergebnisse verwenden)**

Calibrator	A450 nm	Konz. E/mL	A405 nm	Konz. E/mL
B1	0,068	10	0,023	10
B2	0,138	20	0,043	20
B3	0,610	75	0,184	75
B4	2,838	500	0,853	500
B5	8,089	2000	2,379	2000
Negative Control (D)	0,015	0	0,008	0
Positive Control (CI)	0,402	46	0,121	46
Positive Control (CII)	1,221	200	0,367	196

Sollten Extinktionswerte bei 450 nm über 3,0 liegen, kann der Extinktionswert bei 405 nm durch Multiplizieren mit einem entsprechenden Faktor (3,4 im Fall von bei RSR verwendeter Geräte) in 450 nm-Extinktionswerte umgerechnet werden.



## ASSAY CUT-OFF

Negativ	< 15 E/mL
Positiv	≥ 15 E/mL

Dieser Cut-off wurde bei RSR validiert. Jedoch sollte jedes Labor seinen eigenen normal und pathologische Referenzbereiche für ZnT8-Ak-Spiegel festlegen. Außerdem wird empfohlen, dass jedes Labor sein eigenes Panel an Kontrollproben im Assay mitführt.

## KLINISCHE BEWERTUNG

### Klinische Spezifität und Sensitivität

In der IASP-Studie 2016 erreichte das RSR ZnT8 Ab ELISA-Kit 99% (n=90) Spezifität und 72% (n=50) Sensitivität.

Die Bestimmung von 297 gesunden Blutspendersonen ergab einen Mittelwert von  $1,9 \pm 3,84$  E/mL, 3 Seren (1%) lagen mit Werten von 45, 41 und 19 E/mL über dem Assay Cut-off.

### Untere Nachweisgrenze

Die Negative Control wurde 20 Mal getestet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze betrug bei 2 Standardabweichungen 1,2 E/mL, wenn der Negative Control ein Wert von 1 E/mL zugewiesen wurde.

### Inter-Assay Präzision

Probe	Mittelwert E/mL (n=20)	VK (%)
A	102	9,3
B	64	7,5
C	26,6	8,7

### Intra Assay Präzision

Probe	Mittelwert E/mL (n=25)	VK (%)
1	160	6,2
2	63	6,2
3	24,5	3,5

### Klinische Genauigkeit

Seren mit Rheumafaktor (n=26) und Seren mit Autoantikörpern gegen Thyreoglobulin (n=20), gegen Schilddrüsenperoxidase (n=24), gegen Aquaporin-4 (n=3) und gegen den Acetylcholinrezeptor (n=9) waren negativ für ZnT8 Ab. 4% (n=24) der Seren positiv für Antikörper gegen den TSH-Rezeptor und 9% (n=23) der Seren positiv für 21-Hydroxylase-Ab, waren unter Verwendung des RSR ZnT8 Ab ELISA Kits positiv für ZnT8 Ab.

### Interferenzen

Es wurde keine Interferenz beobachtet, wenn Proben mit folgenden Substanzen versetzt wurden: Hämoglobin bei 500 mg/dL, Bilirubin bei 20 mg/dL oder Intralipid bis zu 3000 mg/dL.

## SICHERHEITSHINWEISE

### Streptavidin Peroxidase (SA-POD)

Signalwort: Achtung



Gefahrenhinweis(e)

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Sicherheitshinweis(e)

P280: Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

P302 + P352: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

### Peroxidase Substrate (TMB)

Signalwort: Gefahr



Gefahrenhinweis(e)

H360: Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen

Sicherheitshinweis(e)

P280: Schutzhandschuhe/

Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

P308 + P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

### Diluent for SA-POD

Gefahrenhinweis(e)

EUH208: Enthält 2-Chloracetamid. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Dieses Kit ist nur für den Gebrauch durch Fachpersonal bestimmt. Befolgen Sie die Anweisungen sorgfältig. Beachten Sie die auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten und die angegebenen Haltbarkeiten für rekonstituierte Reagenzien.

Ausführlichere Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt. Vermeiden Sie alle Handlungen, die wahrscheinlich zu einer Einnahme führen können. Kontakt mit Haut und Kleidung vermeiden. Schutzkleidung tragen. Das bei der Herstellung des Kits verwendete Material menschlichen Ursprungs wurde getestet und als nicht reaktiv auf HIV1- und HCV-Antikörper und HBsAg befunden, sollte es aber dennoch als potenziell infektiös behandelt werden. Waschen Sie sich gründlich die Hände, wenn eine Kontamination aufgetreten ist und bevor Sie das Labor verlassen. Sterilisieren Sie alle potenziell kontaminierten Abfälle, inklusive Testproben vor der Entsorgung. Das bei der Herstellung des Kits verwendete Material tierischen Ursprungs stammt von Tieren, die als gesund zertifiziert wurden, jedoch sollten diese Materialien als potenziell infektiös behandelt werden. Einige Komponenten enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie wie bei allen Kit-Komponenten das Verschlucken, Einatmen, Injizieren oder den Kontakt mit der Haut, Augen oder Kleidung. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie reichlich mit Wasser nachspülen.

## ASSAY PLAN

Tag 1	Alle Reagenzien und Proben mit Ausnahme von ZnT8-Biotin und Reconstitution Buffer for ZnT8-Biotin am Tag der Verwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) bringen	
	Pipettieren:	<b>25 µL</b> Calibrators, Controls und Patientenseren in alle Vertiefungen (außer Blanks) und für 5 Sekunden schütteln
	Inkubieren:	Über Nacht (16-20 Stunden) bei 2-8 °C ohne Schütteln
Tag 2	Aspirieren/Dekantieren:	Vertiefungen
	Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen und auf saugfähigem Tuch trockenklopfen <sup>1</sup>
	Pipettieren:	<b>100 µL kalte</b> ZnT8-Biotin (rekonstituiert) in jede Vertiefung (außer Blanks)
	Inkubieren:	1 Stunde bei 2-8 °C ohne Schütteln
	Aspirieren/Dekantieren:	Vertiefungen
	Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen und auf saugfähigem Tuch trockenklopfen <sup>1</sup>
	Pipettieren:	<b>100 µL SA-POD</b> (verdünnt 1:20) in jede Vertiefung (außer Blanks)
	Inkubieren:	20 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm
	Aspirieren/Dekantieren:	Vertiefungen
	Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen, ein Mal mit Reinstwasser spülen und auf saugfähigem Tuch trockenklopfen <sup>1</sup>
	Pipettieren:	<b>100 µL TMB</b> in jede Vertiefung (einschließlich Blanks)
	Inkubieren:	20 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) <b>im Dunkeln</b>
	Pipettieren:	<b>100 µL Stop Solution</b> in jede Vertiefung (einschließlich Blanks) und für 5 Sekunden schütteln
	Innerhalb von 30 Minuten nach der Zugabe der Stop Solution die Extinktion bei 405 nm und dann bei 450 nm messen	
	<sup>1</sup> Wenn ein automatischer Plattenwascher verwendet wird, ist es nicht erforderlich, die Platten nach dem Waschen trockenzuklopfen. Ebenso kann der Waschschrift mit Reinstwasser weggelassen werden.	