

ElisaRSR™ Fast ZnT8 Ab™

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: <u>info@rsrltd.com</u> Website: <u>www.rsrltd.com</u>



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr., Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta.

ZWECKBESTIMMUNG

Das RSR Fast ZnT8 Autoantibody (ZnT8 Ab) ELISA Kit ist zur quantitativen Bestimmung ZnT8 (ZnT8-Ak) Autoantikorpern gegen Humanserum und nur fur die Verwendung durch Fachpersonal bestimmt. Autoantikorper gegen Pankreas-Beta-Zell-Antigene sind serologische Marker des Typ-1-Diabetes mellitus (Typ-1-DM). Zu den von diesen Antikorpern erkannten Antigenen gehoren Insulin, Glutaminsaure-decarboxylase (GAD65 kDa-Isoform), das Inselzellantigen IA-2 oder ICA-512 und der Zinktransporter 8 (ZnT8). ZnT8-Ak hauptsachlich auf die C-terminale Domane von ZnT8 gerichtet (Aminosaurereste 268 - 369). Der Genpolymorphismus der menschlichen Population am Codon fur die 325. Aminosaure fuhrt zur Expression von drei Proteinvarianten: Arginin (R) 325, Tryptophan (W) 325 und sehr selten Glutamin (Q) 325. ZnT8-Ak konnen spezifisch sein fur R 325 oder die W 325-Variante, oder unspezifisch sein für den Aminosaurerest-325. Seren, die nur mit dem Q-Allel reagieren, sind extrem selten. Der Fast ZnT8-Ab-ELISA von RSR kann Autoantikorper nachweisen und quantifizieren, die fur R 325 oder W 325 spezifisch sind oder fur Aminosaurerest-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 <u>52</u>: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:

Europaische 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 Fast ZnT8 Ab ELISA von RSR binden ZnT8-Ak in Patientenseren, Kalibratoren und Kontrollen an dem den ELISA-Plattenvertiefungen beschichteten ZnT8. Nach einer 2-stundigen Inkubation werden die Uberstande verworfen, wobei an das ZnT8 gebundene ZnT8-Ak zuruckbleiben. ZnT8-Biotin wird in einem 2. Inkubationsschritt zugegeben. Die ZnT8-Ak in den Proben binden als Brucke 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 bestimmt. Uberschussiges, ungebundenes SA-POD wird dann weggewaschen 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 Stopplosung gestoppt, wobei der Inhalt der Vertiefung gelb wird. Die Extinktion der gelben Reaktionsmischung bei 405 nm und 450 nm dann unter Verwendung eines ELISA-Plattenlesegerats gemessen. Eine hohere Extinktion zeigt das Vorhandensein von ZnT8-Ak in der Testprobe an. Das Ablesen bei 405 nm ermoglicht die Quantifizierung hoher Extinktionen und sollte verwendet werden, wenn die OD bei 450 nm großer ist als 3,0. Wenn bei nur einer Wellenlange gemessen werden kann, konnen 405 nm verwendet werden. Das Messintervall betragt 10 - 2000 E/mL (E = beliebige RSR-Einheiten).

Der Fast ZnT8 Ab ELISA Kit kann innerhalb von 4 Stunden und ohne Kuhlung durchgefuhrt werden. Dadurch eignet sich der Test insbesondere fur Nutzer von ELISA Automaten.

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 fur ein Assay (Doppelbestimmungen mit je 25 µL). Wiederholtes Einfrieren, Auftauen oder Erhohungen in der Lagertemperatur sollten vermieden werden. Lipamische oder hamolytische Seren sollten nicht verwendet werden. Falls erforderlich. Testseren bei Raumtemperatur auftauen lassen und vorsichtig mischen, um ihre Homogenitat zu gewahrleisten. Die Seren vor dem Assay zentrifugieren (vorzugsweise fur 5 min bei 10-15,000 rpm in einer Mikrozentrifuge), um Partikel zu entfernen. Lassen Sie diesen

Zentrifugationsschritt bitte nicht weg, sollten die Seren trub sein oder Partikel enthalten.

SYMBOLE

Symbol	Bedeutung	
CE	Konformitatserklarung	
IVD	In-vitro-Diagnostikum	
REF	Katalognummer	
LOT	Chargennummer	
[]i	Gebrauchsanweisung beachten	
***	Hersteller	
Σ	Inhalt ausreichend fur X Bestimmungen	
	Ungeoffnet verwendbar bis	
2°C 8°C	Begrenzung der Lagertemperatur	
CONTROL .	Negative Control	
CONTROL +	Positive Control	

ZUSATZLICH BENOTIGTE MATERIALIEN

Pipetten zu Dispensieren von 25 μL und 100 $\mu L.$ Gefaße zum Messen verschiedener Volumina, zum Rekonstituieren oder Verdunnen der mitgelieferten Reagenzien.

Reinstwasser

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

ELISA-Plattenschuttler mit einer Schuttelgeschwindigkeit von 500 rpm (kein Orbitalschuttler).

ELISA-Plattenabdeckung

VORBEREITUNG DER MITGELIEFERTEN REAGENZIEN

Ungeoffnete Kits und alle Kitkomponenten bei 2-8 $^{\rm o}\,\text{C}$ lagern.

	ZnT8 Coated Wells	
	12 teilbare Streifen mit je 8 Vertiefungen	
	(insgesamt 96) in einem Rahmen und in	
	einem Folienbeutel versiegelt. Vor dem	
	Offnen mindestens 30 Minuten bei	
	Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen.	
	Stellen Sie sicher, dass die benotigten	
Α	Vertiefungen fest in den mitgelieferten	
	Rahmen eingepasst sind. Nach dem Offnen	
	unbenotigte 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.	

B1-5	Calibrators 10, 20, 75, 500, 2000 u/mL (=E/mL, willkurlich festgelegte RSR Einheiten) 5 x 0,7 mL Gebrauchsfertig
C1-2	Positive Controls I & II (Siehe Etikett fur Konzentrationsbereich) 2 x 0,7 mL Gebrauchsfertig
D	Negative Control 0,7 mL Gebrauchsfertig
	ZnT8-Biotin 3 Flaschchen Lyophilisiert
E	Jedes Flaschchen mit 5,5 mL Reconstitution Buffer for ZnT8-Biotin (F) rekonstituieren. Wenn mehr als ein Flaschchen verwendet wird, die Flaschchen poolen und vor Gebrauch vorsichtig mischen. Nach der Rekonstitution bei 2-8°C bis zu 3 Tage lagerbar.
F	Reconstitution Buffer for ZnT8-Biotin 2 x 15 mL, rot gefarbt Gebrauchsfertig
	Streptavidin Peroxidase (SA-POD) 0,7 mL Konzentrat
G	Vor Gebrauch 1:20 mit Diluent for SA-POD (H) verdunnen. Zum Beispiel 0,5 mL (G) + 9,5 mL (H). Nach dem Verdunnen bis zu 16 Wochen bei 2-8°C lagerbar.
Н	Diluent for SA-POD 15 mL Gebrauchsfertig
J	Peroxidase Substrate (TMB) 15 mL Gebrauchsfertig
K	Stop Solution 12 mL Gebrauchsfertig
	Concentrated Wash Solution 125 mL Konzentrat
L	Vor Gebrauch 10 x mit Reinstwasser verdunnen. Zum Beispiel 100 mL (J) + 900 mL Reinstwasser. Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum des Kits lagerbar.

TESTVERFAHREN

Am Tag der Verwendung alle Reagenzien vor Gebrauch mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen. Fur die Schritte 4, 7, 10 und 11 wird ein Mehrfachdispenser (z. B. Eppendorf Multipette®) empfohlen.

1.	Je 25 μL 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 und fur 2
	Stunden bei Raumtemperatur auf einem
	ELISA-Plattenschuttler (500 rpm)
	inkubieren.
3.	Mit einem ELISA-Plattenwascher die
	Vertiefungen drei Mal mit verdunnter

	Wash Solution (L) waschen und absaugen. Wenn kein Plattenwascher
	absaugen. Wenn kein Plattenwascher
	verfugbar ist, den Inhalt der
	Vertiefungen entleeren durch rasches
	Umdrehen der Vertiefungen uber einem
	geeigneten Behalter, drei Mal manuell
	waschen und anschließend die
	Vertiefungen umgedreht auf eine
	saubere, trockene, saugfahige
	Oberflache vorsichtig trockenklopfen.
4.	Je 100 μL 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
	Raumtemperatur fur 1 Stunde auf
	einem ELISA-Plattenschuttler (500 rpm)
	inkubieren.
6.	Waschschritt 3 wiederholen.
7.	Je 100 μL verdunnter SA-POD (G) in
	jede Vertiefung (außer Blank)
	pipettieren.
8.	Die Vertiefungen abdecken und bei
•.	Raumtemperatur fur 20 Minuten auf
	einem ELISA-Plattenschuttler (500 rpm)
	inkubieren.
9.	Waschschritt 3 wiederholen. Beim
0.	manuellen Waschen, abschließend einen
	zusatzlichen Waschschritt mit
	Reinstwasser durchfuhren (um
	eventuellen Schaum zu entfernen), dann
	erst die Vertiefungen umgedreht
	, , ,
10	trockenklopfen.
10.	Je 100 μL TMB (J) in jede Vertiefung
	(einschließlich Blank) pipettieren und im
	Dunkeln bei Raumtemperatur fur 20
<u> </u>	Minuten ohne Schutteln inkubieren.
11.	Je 100 μL Stop Solution (K) in jede
	Vertiefung (einschließlich Blank)
	pipettieren, Die Vertiefungen abdecken
	und fur ca. 5 Sekunden auf einem
	Plattenschuttler schutteln. Die Dauer
	der Substratinkubation sollte bei allen
	Vertiefungen gleich lang sein.
12.	Innerhalb von 15 Minuten die Extinktion
	jeder Vertiefung bei 405 nm, dann bei
	450 nm mit einem ELISA-
	Plattenlesegerats bestimmen, dabei bei
	jeder Vertiefung den Wert des Blanks
	abziehen (Vertiefungen mit nur 100 µL
	TMB (J) und 100 μL Stop Solution (K)).
	(c) and too pe otop colution (R/).

TESTAUSWERTUNG

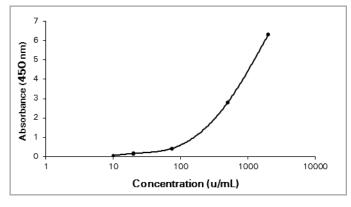
Eine Kalibrierkurve kann erstellt werden, indem die Konzentration der Calibrators auf der x-Achse (logarithmische Skala) gegen die Extinktion der Calibrators auf der y-Achse (lineare Skala) aufgetragen werden. Die ZnT8-Ak-Konzentrationen in Patientenseren konnen dann aus der Eichkurve [aufgetragen bei RSR als Spline-Log/Lin-Kurve (Glattungsfaktor = 0)] abgelesen werden. Andere Datenreduktionssysteme konnen 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 konnen in der Negative Control (D) des Kits verdunnt werden. Beispiel: 15 μ L Probe plus 135 μ L Negative Control fur eine 10-fache Verdunnung. Andere Verdunnungen (z. B. 100x) konnen aus einer 10x-Verdunnung oder auf andere Weise nach Bedarf hergestellt werden. Es kann vorkommen, dass einige Seren sich nicht linear verdunnen.

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

Calibrator	A450 nm	Konz. E/mL	A405 nm	Konz. E/mL
B1	0,063	10	0,020	10
B2	0,172	20	0,053	20
В3	0,436	75	0,130	75
B4	2,803	500	0,864	500
B5	6,314	2000	1,825	2000
Negative Control (D)	0,012	0	0,005	0
Positive Control (CI)	0,406	70	0,123	72
Positive Control (CII)	1,194	187	0,351	174

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



ASSAY CUT-OFF

Negativ	< 10 E/mL
Positiv	≥ 10 E/mL

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

KLINISCHE BEWERTUNG

Klinische Spezifitat und Sensitivitat

Seren von 640 gesunden Blutspendern wurden mit dem RSR Fast ZnT8 Ab ELISA-Kit getestet. 631 (98,6%) wurden als negativ fur ZnT8 Antikorper identifiziert.

Fur IASP 2016 Proben war die Sensitivitat 72% (n = 50) und die Spezifitat 97% (n = 90).

Untere Nachweisgrenze

Die Negative Control zugewiesen als 1.0 E/mL wurde 20 Mal getestet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze betrug bei +2 Standardabweichungen 5,0 E/mL unter Standard Laborbedingungen, und 2,4 E/mL, durchgefuhrt auf einem Dynex DS2 automatischen ELISA Gerat.

Inter-Assay Prazision

Probe	Mittelwert E/mL (n = 20)	VK (%)
Α	26,3	10,1
В	52,4	12,7
С	208,7	6,2
D	403,6	8,4

Intra Assay Prazision

Probe	Mittelwert E/mL (n = 25)	VK (%)
1	20,8	4,4
2	31,0	5,7
3	208,6	2,6
4	357,0	6,5

Klinische Genauigkeit

Seren mit Rheumafaktor (n=20) und Seren mit Autoantikorpern gegen TSH-Rezeptor (n=81) und 40 Typ 2 Diabetes mellitus Patientenseren waren negativ fur ZnT8 Ab. 15 von 39 Seren von Latent Autoimmun Diabetes von Erwachsenen (LADA) waren positiv fur ZnT8 Antikorper.

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 BERUHRUNG MIT DER HAUT:

Mit viel Wasser und Seife waschen.

P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Arztlichen Rat einholen / arztliche Hilfe hinzuziehen. P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Peroxidase Substrate (TMB)

Signalwort: Gefahr Gefahrenhinweis(e)



H360: Kann die Fruchtbarkeit beeintrachtigen oder das Kind im Mutterleib schadigen

Sicherheitshinweis(e)

P280: Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

P308 + P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Arztlichen Rat einholen / arztliche Hilfe hinzuziehen.

Diluent for SA-POD Gefahrenhinweis(e)

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

Dieses Kit ist nur fur den Gebrauch durch Fachpersonal bestimmt. Befolgen Sie die Anweisungen sorgfaltig. Beachten Sie die auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten und angegebenen Haltbarkeiten fur rekonstituierte Reagenzien. Ausfuhrlichere Sicherheitsinformationen finden Sie Sicherheitsdatenblatt. Vermeiden Sie alle Handlungen, die wahrscheinlich zu einer Einnahme fuhren konnen. Kontakt mit Haut und Kleidung vermeiden. Schutzkleidung tragen. Das bei der Herstellung des Kits verwendete menschlichen Ursprungs wurde getestet und als nicht reaktiv auf HIV1- und HIV2- und HCV-Antikorper und HBsAg befunden, sollte es aber. dennoch. als potenziell infektios behandelt werden. Waschen Sie sich grundlich die Hande, wenn eine Kontamination aufgetreten ist und bevor Sie das Labor verlassen. Sterilisieren Sie alle potenziell kontaminierten Abfalle. 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 infektios behandelt werden. Einige Komponenten enthalten geringe Mengen Natriumazid 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 nachspulen.

ASSAY PLAN

	25 μL Calibrators, Controls und Patientenseren in alle Vertiefungen (außer
Pipettieren:	Blanks)
Inkubieren:	2 Stunden bei Raumtemperatur (20-25°C) auf einem ELISA-Plattenschuttler bei 500 rpm
Aspirieren/Dekantieren:	Vertiefungen
Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen und auf saugfahigem Tuch trockenklopfen ¹
Pipettieren:	100 μL ZnT8-Biotin (rekonstituiert) in jede Vertiefung (außer Blanks)
Inkubieren:	1 Stunde bei Raumtemperatur (20-25°C) auf einem ELISA-Plattenschuttler bei 500 rpm
Aspirieren/Dekantieren:	Vertiefungen
Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen und auf saugfahigem Tuch trockenklopfen ¹
Pipettieren:	100 μL SA-POD (verdunnt 1:20) in jede Vertiefung (außer Blanks)
Inkubieren:	20 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) auf einem ELISA-Plattenschuttler bei 500 rpm
Aspirieren/Dekantieren:	Vertiefungen
Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen, ein Mal mit Reinstwasser spulen und auf saugfahigem Tuch trockenklopfen ¹
Pipettieren:	100 μL TMB in jede Vertiefung (einschließlich Blanks)
Inkubieren:	20 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) im Dunkeln
Pipettieren:	100 μL Stop Solution in jede Vertiefung (einschließlich Blanks) und fur 5 Sekunden schutteln

Innerhalb von 15 Minuten nach der Zugabe der Stop Solution die Extinktion bei 405 nm und dann bei 450 nm messen

¹ Wenn ein automatischer Plattenwascher verwendet wird, ist es nicht erforderlich, die Platten nach dem Waschen trockenzuklopfen. Ebenso kann der Waschschritt mit Reinstwasser weggelassen werden.