



## Arbeitsanleitung

# 21-Hydroxylase Ab ELISA

M. Addison, autoimmune polyglanduläre Syndrome Typ I/II

### Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von 21-Hydroxylase-Autoantikörpern in Serum



**REF** EA112/96

 12 x 8

  $+2$   $\frac{+8}{^{\circ}\text{C}}$  2 – 8 °C

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH  
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Germany • Tel.: +49 40 5558710 • Fax: +49 40 55587111  
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • Email: [contact@dld-diagnostika.de](mailto:contact@dld-diagnostika.de)

## Inhaltsverzeichnis

1. Klinische Bedeutung und Testprinzip	Seite	3
2. Vorsichtsmaßnahmen	Seite	3
3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien	Seite	4
4. Inhalt des Testbestecks	Seite	4
5. Probengewinnung und Aufbewahrung	Seite	5
6. Vorbereitung der Proben und Reagenzien	Seite	6
7. Testdurchführung	Seite	6
8. Testauswertung	Seite	8
9. Testcharakteristik	Seite	9
10. Literatur	Seite	11
Pipettierschema	Seite	12

## 1. Klinische Bedeutung und Testprinzip

Die Zerstörung der Nebennierenrinde durch Autoantikörper ist die häufigste Ursache für einen M. Addison. Autoantikörper gegen die 21-Hydroxylase (21-OH) der Nebenniere sind ein wichtiger Marker für eine Autoimmunerkrankung der Nebenniere, die sich als M. Addison oder im Rahmen von autoimmun bedingten polyglandulären Syndromen vom Typ I oder II zeigt.

Im 21-OH Ab ELISA binden die Antikörper aus Patientenserum, Standards und Kontrollen an die mit 21-Hydroxylase beschichtete Mikrotiterplatte. Nach Inkubation über Nacht und einem Waschschrift wird biotinylierte 21-Hydroxylase zugegeben, die an weitere Bindungsstellen der an der Platte gebundenen Antikörper bindet. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wird der Überstand verworfen. Der an der Mikrotiterplatte gebundene 21-OH-Biotin-Autoantikörper Komplex wird in einem zweiten Inkubationsschritt durch Zugabe von Streptavidin-Peroxidase (SA-POD) und nachfolgender Zugabe des Substrats TMB detektiert.

## 2. Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.
- Die angegebenen Verfallsdaten sind unbedingt zu beachten.
- Die Reagenzien bis zur Verwendung bei 2 - 8 °C lagern.
- Während der Testdurchführung Einmal-Handschuhe tragen.
- Einige der Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. Verschlucken und Berühren mit der Haut vermeiden.
- 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 **MT-Streifen** **STRIPS** 12 Streifen  
Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen,  
einzeln abbrechbar, beschichtet mit 21-Hydroxylase

4.2 **Standards A – D** **CAL A** – **CAL D** 4 Fläschchen  
je 0,7 ml , gebrauchsfertig  
Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D
U/ml	0,3	1	10	100

4.3 **Positive Kontrollen** **CONTROL I** + **CONTROL II** 2 Fläschchen  
Je 0,7 ml, gebrauchsfertig  
Zielwerte und -bereiche siehe QC-Zertifikat

4.4 **Negative Kontrolle** **CON -** 1 Fläschchen  
0,7 ml, gebrauchsfertig

4.5 **Reaction Enhancer** **ENHANCER** 1 Fläschchen  
6 ml, rot eingefärbt, gebrauchsfertig

4.6 **21-OH-Biotin** **21-OH-BIOTIN** 3 Fläschchen  
5,5 ml pro Fläschchen, lyophilisiert

4.7 **Rekonstitutionspuffer** **RECONST** 2 Fläschchen  
je 10 ml, gebrauchsfertig  
zum Auflösen des 21-OH-Biotin

4.8	<b>Streptavidin-Peroxidase</b> 0,7 ml, 20 x konzentriert	<b>SA-POD</b>	1 Fläschchen
4.9	<b>Verdünnungspuffer</b> 15 ml, gebrauchsfertig zum Verdünnen von SA-POD	<b>DIL</b>	1 Fläschchen
4.10	<b>Substrat</b> 15 ml, Tetramethyl-Benzidin (TMB), gebrauchsfertig	<b>SUB</b>	1 Fläschchen
4.11	<b>Waschpuffer</b> 125 ml, 10 x konzentriert	<b>WASH</b>	1 Fläschchen
4.12	<b>Stopplösung</b> 12 ml, gebrauchsfertig	<b>STOP</b>	1 Fläschchen

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 50 und 100 µl
- Schüttler mit 500 rpm geeignet für ELISA Platten, kein Orbitalschüttler
- Vortex-Mischer
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 und 405 nm)
- Destilliertes Wasser

## 5. Probengewinnung und Aufbewahrung

Für den Test soll Serum eingesetzt werden. Plasma ist für den Test nicht geeignet. 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 sollten bald nach Gewinnung eingesetzt werden und können eingefroren bei -20 °C für einen längeren Zeitraum gelagert werden.

## 6. Vorbereitung der Proben und Reagenzien

### Mikrotiterstreifen **STRIPS**

Vor Öffnen der Mikrotiterstreifen sollten die Päckchen für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur gebracht werden. Nach Öffnen ungenutzte Streifen zurück in die Originalverpackung legen und gut verschließen. Den Beutel dann in den beiliegenden Clipbeutel mit dem Trockenmittel legen, gut verschließen und bei 2-8 °C bis zu 6 Monate lagern.

### 21-OH-Biotin **21-OH-BIOTIN**

Unmittelbar vor Gebrauch Inhalt jedes Fläschchens mit 5,5 ml Rekonstitutionspuffer auflösen. Wenn mehr als ein Fläschchen benötigt wird, den Inhalt mehrerer Fläschchen poolen und gut mischen. Nicht genutzte Lösung verwerfen. Eine Lagerung des gelösten 21-OH-Biotin ist nicht möglich.

### Streptavidin-Peroxidase **SA-POD**

SA-POD mit 1:20 mit Verdünnungspuffer verdünnen (z.B. 0,5 ml SA-POD + 9.5 ml Verdünnungspuffer). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2-8 °C für 16 Wochen haltbar.

### Waschpuffer **WASH**

Waschpuffer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar.

## 7. Testdurchführung

Vor der Testdurchführung alle Komponenten des Tests mindestens für 30 Minuten auf Raumtemperatur bringen.

1. 50 µl (Doppelbestimmung) Patientenseren, Standard A bis D, Negative und Positive Kontrollen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren. Eine Vertiefung für Blank-Wert freilassen.
2. 50 µl Reaction Enhancer in alle Vertiefungen (außer Blank) pipettieren. Mikrotiterstreifen abdecken und für 1 Minuten auf einem Schüttler bei mittlerer Geschwindigkeit (ca. 500 Bewegungen pro Min) schütteln. Anschließend Mikrotiterplatte bei 2–8 °C über Nacht (16–20 Stunden) ohne Schütteln inkubieren.

3. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünnter Waschlösung füllen, und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 3 x durchführen.
4. 100 µl des rekonstituierten 21-OH-Biotin in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren, die Mikrotiterplatte abdecken und für 1 Stunde bei Raumtemperatur (20–25 °C) auf einem Schüttler bei mittlerer Geschwindigkeit (ca. 500 Bewegungen pro Min) inkubieren.
5. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünnter Waschlösung füllen, und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 3 x durchführen.
6. 100 µl verdünnte SA-POD Lösung in jede Vertiefung (außer Blank). pipettieren. Mikrotiterstreifen abdecken und für 20 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) auf einem Schüttler bei mittlerer Geschwindigkeit (ca. 500 Bewegungen pro Min) inkubieren.
7. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünnter Waschlösung füllen, und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 3 x durchführen.
8. 100 µl Substratlösung (TMB) in jede Vertiefung pipettieren (inkl. Blank) und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen ohne Schütteln inkubieren.
9. Je 50 µl Stopplösung in jede Vertiefung (inkl. Blank) pipettieren und für 5 Sekunden auf dem Schüttler mischen.
10. Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Meßwellenlänge von 450 nm und 405 nm gegen den Blankwert (100 µl Substrat + 100 µl Stopplösung) messen.

## 8. Testauswertung

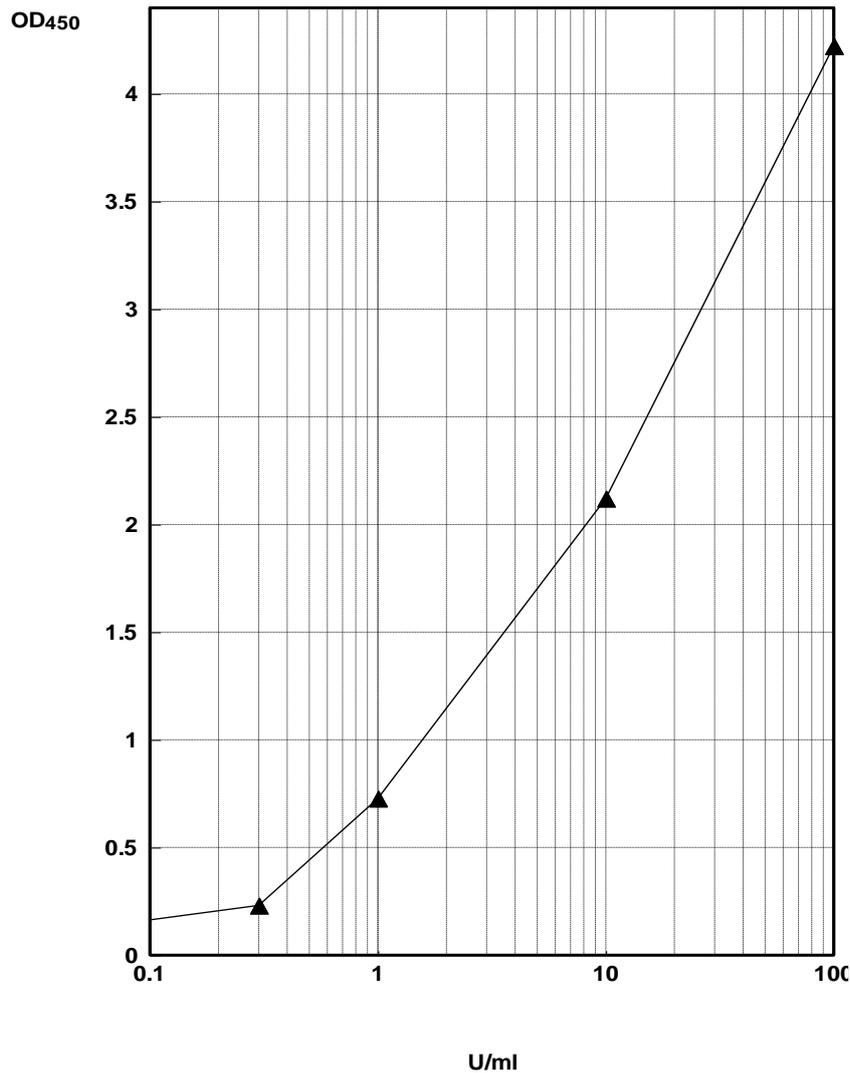
Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Die Konzentrationen der Patientenproben können dann direkt aus der Standardkurve in U/ml abgelesen werden. Für die Berechnung der Standardkurve wird eine log/lin Spline Funktion mit einem Glättungsfaktor von 0 empfohlen. Für die Auswertung kann für die Negative Kontrolle ein Wert von 0,03 U/ml angenommen werden.

Patientenproben mit 21-OH Autoantikörperkonzentrationen über 100 U/ml können mit Serum, das keine 21-OH Autoantikörper enthält, typischerweise 1:10 oder 1:100 verdünnt werden. Einige Seren werden dabei nicht linear verdünnen.

### Typisches Beispiel

Typische Werte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

	OD 450 nm	Konz. U/ml	OD 405 nm	Konz. U/ml
Neg. Kontrolle	0,090		0,028	
Standard A	0,231	0,3	0,073	0,3
Standard B	0,728	1	0,232	1
Standard C	2,121	10	0,679	10
Standard D	4,223	100	1,242	100
Kontrolle I	0,464	0,57	0,151	0,59
Kontrolle II	1,684	5,37	0,541	5,32



## 9. Testcharakteristik

### Klinische Spezifität

Proben von 928 gesunden Blutspendern wurden im 21-OH Autoantikörper ELISA gemessen. 922 (99,4%) waren negativ. Die 6 positiv gefundenen Proben (0,59, 0,93, 1,2, >100 und >100 U/ml) enthielten alle IgM Antikörper gegen 21- Hydroxylase.

### Klinische Sensitivität

Proben von 100 Patienten mit der Diagnose autoimmun bedingter M. Addison wurden im 21-OH Ab ELISA gemessen. 86 (86%) der Proben wurden positiv gefunden.

### Untere Nachweisgrenze

Die negative Kontrolle wurde 20 fach gemessen und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze bei der 2fachen Standardabweichung lag bei 0,13 U/ml.

### Klinische Richtigkeit

Die Messung von 185 Seren von Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen ohne M. Addison zeigten keine Kreuzreaktion mit Autoantikörpern gegen Thyreoglobulin, Schilddrüsenperoxidase, TSH Rezeptor, Glutaminsäuredecarboxylase (GAD), Zinktransporterprotein 8, AQP-4, VGKC, dsDNA, Acetylcholinrezeptor oder Rheumafaktor.

Eine Probe eines Patienten mit Typ1 Diabetes (GAD Ab positiv) zeigte eine Konzentration von 44 U/ml. Diese Probe zeigte auch im 21-OH-RIA eine positives Ergebnis mit 100 U/ml. Ein weiterer Patient mit Typ1 Diabetes (ZnT8 Ab positiv) zeigte eine schwach positives Ergebnis von 0,53 U/ml. Diese Probe war im 21-OH-RIA negativ. Eine weitere Probe mit positiven ACHRAB zeigte eine Konzentration von 0,61 U/ml im 21-OH Ab ELISA.

### Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=25)

Probe	MW U/ml	VK (%)
1	0,30	2,7
2	0,89	6,1
3	2,0	6,3
4	5,4	18,1
5	55	9,9

Inter-Assay (n=20)

Probe	MW U/ml	VK (%)
1	0,39	4,1
2	1,0	7,4
3	2,7	17,9
4	10,7	11,5
5	58,7	14,0

### Referenzbereich

Negativ < 0,4 U/ml  
Positiv ≥ 0,4 U/ml

## 10. Literatur

J Furmaniak and B. Rees Smith, J Clin Endocrinol Metab 1995 **80**: 1502-1505 Editorial: Adrenal and gonadal autoimmune diseases

S Chen et al, J Clin Endocrinol Metab 1996 **81**: 1871-1876 Autoantibodies to steroidogenic enzymes in autoimmune polyglandular syndrome, Addison's disease, and premature ovarian failure

H Tanaka et al, J Clin Endocrinol Metab 1997 **82**: 1440-1446 Steroid 21-Hydroxylase autoantibodies: Measurements with a new immunoprecipitation assay

G Coco et al, J Clin Endocrinol Metab 2006 **91**: 1637-1645 Estimated risk for developing autoimmune Addison's disease in patients with adrenal cortex autoantibodies

E. S. Husebye et al, J. Intern. Med. 2014 **275**:104-115  
Consensus Statement on the Diagnosis, Treatment and Follow-up of Patients with Primary Adrenal Insufficiency.

### Verwendete Symbole

 IVD	In-Vitro-Diagnostikum		CE markiert
 CONT	Inhalt		Verwendbar bis
 LOT	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
 REF	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

## Pipettierschema

	B <sub>0</sub>	Standard A - D	Positive Kontrollen I/II	Patienten -serum
Negative Kontrolle $\mu\text{l}$	50			
Standard A-E $\mu\text{l}$		50		
Positive Kontrollen $\mu\text{l}$			50	
Patientenserum $\mu\text{l}$				50
React. Enhancer $\mu\text{l}$	50	50	50	50

1 Minute auf Schüttler (500 rpm) mischen

über Nacht (16-20 h) bei 2-8 °C (ohne Schütteln) inkubieren

entleeren, 3 x waschen mit 300  $\mu\text{l}$  Waschpuffer

21-OH-Biotin $\mu\text{l}$	100	100	100	100
----------------------------	-----	-----	-----	-----

1 Stunde bei Raumtemperatur auf Schüttler (500 rpm) inkubieren

entleeren, 3 x waschen mit 300  $\mu\text{l}$  Waschpuffer

SA-POD verd. $\mu\text{l}$	100	100	100	100
----------------------------	-----	-----	-----	-----

20 Minuten bei Raumtemperatur auf Schüttler (500 rpm) inkubieren

entleeren, 3 x mit 300  $\mu\text{l}$  Waschpuffer waschen

TMB-Substrat $\mu\text{l}$	100	100	100	100
----------------------------	-----	-----	-----	-----

20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen (ohne Schütteln!) inkubieren

Stopplösung $\mu\text{l}$	50	50	5	50
---------------------------	----	----	---	----

5 Sekunden schütteln

Messung der Extinktion bei 450 nm und 405 nm innerhalb von 20 Minuten