



Arbeitsanleitung

Zink Transporter 8 (ZnT8) Antibody ELISA

**Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
ZnT8-Autoantikörpern
in Serum**



REF EA102/96

 12 x 8

 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> • e-mail: contact@dld-diagnostika.de

Inhaltsverzeichnis

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

Verwendete Symbole

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

1. Klinische Bedeutung und Testprinzip

Das kationische Efflux Transporter-Protein ZinkT8 (ZnT8) wurde kürzlich als eines der Hauptantigene beim (insulinpflichtigen) Diabetes mellitus Typ 1 (T1D) beschrieben. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wurden in 60-80 % der Fälle ZnT8-Antikörper nachgewiesen. Hingegen betrug die Prävalenz bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) ca. 3 %. Bei Erkrankungen, die mit einem T1D assoziiert sind (Morbus Addison, Zöliakie) wurden ZnT8-Antikörper in bis zu 30 % beobachtet. Interessanterweise wurden ZnT8-Antikörper in 26 % von T1D-Patienten gefunden, bei denen keine der etablierten Diabetes-spezifischen Autoantikörper (Inselzell-Antikörper, Insulin-Antikörper, GAD-Antikörper, IA2-Antikörper) nachweisbar waren. Möglicherweise wird mit diesen Antikörpern ein Subset an T1D-Patienten erfasst (Wenzlau et al. 2007). Weitere Studien zur Evaluierung der klinischen Relevanz dieser Autoantikörper sind erforderlich.

Zitat: Karsten Conrad et al. Autoantikörper bei organspezifischen Autoimmunerkrankungen - Ein diagnostischer Leitfaden 2010.

Autoantikörper gegen den Zink Transporter 8 (ZnT8) sind gegen eine C-terminale Domäne des ZnT8 Moleküls gerichtet (Aminosäuren 268 – 369). Der Genpolymorphismus in der humanen Population auf dem Codon der Aminosäure 325 führt zur Ausbildung von 3 Proteinvarianten: Arginine (R) 325, Tryptophan (W) 325 und sehr selten Glutamine (Q) 325. Die ZnT8 Autoantikörper reagieren meist spezifisch mit der R 325 oder W 325 Variante, oder sie sind unspezifisch bezüglich der Aminosäure 325. Seren, die spezifisch nur mit dem Q Allel reagieren, sind sehr selten. Der anti-ZnT8 ELISA erlaubt den Nachweis und die Quantifizierung von Autoantikörpern gegen die R 325 oder die W 325 Variante sowie von Autoantikörpern ohne Spezifität zu einer Variante der 325 Aminosäure.

Im ZnT8 Autoantikörper ELISA binden die ZnT8-Antikörper im Patientenserum, Standards und Kontrollen an die mit ZnT8 beschichtete Mikrotiterplatte. Nach 16-18 Stunden Inkubation (über Nacht) bei 2-8°C wird der Überstand verworfen. Kaltes ZnT8-Biotin wird hinzugegeben und für 1 Stunde bei 2-8°C inkubiert. Der an der Mikrotiterplatte gebundene ZnT8-Biotin-Autoantikörper Brücken-Komplex wird in einem dritten Inkubationsschritt durch Zugabe von Streptavidin-Peroxidase (SA-POD) und nachfolgender Zugabe des Substrats TMB detektiert.

Der Enzymimmunoassay für den quantitativen Nachweis von ZnT8-Autoantikörpern ist durch folgende Patente geschützt: Europa Patente 1563071 B1 und 2118309 B1, US Patente 7,851,164 B2 und 9,023,984 B2, China Patent CN1738900B, Japan Patente 4498144 und 5694668.

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 ZnT8

- 4.2 **Standards A – E** **CAL A** – **CAL E** 5 Fläschchen
je 0,7 ml , gebrauchsfertig
Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
U/ml	10	20	75	500	2.000

- 4.3 **Positive Kontrollen** **CONTROL I** **CONTROL II** 2 Fläschchen
Je 0,7 ml, gebrauchsfertig
Zielwerte und -bereiche sind im QC-Blatt aufgeführt

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

- 4.5 **ZnT8-Biotin** **ZnT8-BIOTIN** 3 Fläschchen
5,5 ml pro Fläschchen, lyophilisiert

- 4.6 **Rekonstitutionspuffer** **RECONST** 2 Fläschchen
15 ml, rot gefärbt, gebrauchsfertig
zum Auflösen des ZnT8-Biotin

- 4.7 **Streptavidin-Peroxidase** **SA-POD** 1 Fläschchen
0,7 ml, 20 x konzentriert

- 4.8 **Verdünnungspuffer** **DIL** 1 Fläschchen
15 ml, gebrauchsfertig
zum Verdünnen von SA-POD

- 4.9 **Substrat** **SUB** 1 Fläschchen
15 ml, Tetramethyl-Benzidin (TMB),
gebrauchsfertig

- 4.10 **Waschpuffer** **WASH** 1 Fläschchen
125 ml, 10 x konzentriert

- 4.11 **Stopplösung** **STOP** 1 Fläschchen
12 ml, gebrauchsfertig

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten 25 µl, 100 µl
- Schüttler (horizontal)
- Vortex-Mischer
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 und 405 nm)
- Destilliertes Wasser

5. Probengewinnung und Aufbewahrung

Für den Test kann Serum oder Citrat- bzw. Heparinplasma eingesetzt werden. EDTA-Plasma wird nicht empfohlen, da hier niedrigere Werte beobachtet wurden. 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 2 Wochen lagern.

ZnT8-Biotin **ZnT8-BIOTIN**

Unmittelbar vor Gebrauch den Inhalt jedes Fläschchens mit kaltem 5,5 ml Rekonstitutionspuffer (rot eingefärbt) auflösen. Wenn mehr als ein Fläschchen benötigt wird, den Inhalt mehrerer Fläschchen poolen und gut mischen. Aufgelöstes ZnT8-Biotin kann bei 2-8 °C maximal 3 Tage gelagert werden.

Streptavidin-Peroxidase SA-POD

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

Waschpuffer WASH

Waschpuffer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen (z.B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser). 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. **Das gilt nicht für das ZnT8-Biotin und für den Rekonstitutionspuffer, die kühl eingesetzt werden müssen!**

1. 25 µl (Doppelbestimmung) unverdünnte Patientenseren, Standard A bis E, Negative und Positive Kontrollen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren. Eine Vertiefung für Blank-Wert freilassen.
2. Mikrotiterplatte abdecken und für 5 Sekunden auf einem Schüttler schütteln. Danach über Nacht 16 - 20 Stunden bei 2-8 °C ohne Schütteln inkubieren.
3. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünnter Waschlösung füllen, und wieder entleeren. Diesen Vorgang insgesamt 3 x durchführen. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.
4. 100 µl des **kalten rekonstituierten** ZnT8-Biotin in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren, die Mikrotiterplatte abdecken und für 1 Stunde bei 2-8 °C **ohne Schütteln** inkubieren.
5. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünnter Waschlösung füllen, und wieder entleeren. Diesen Vorgang insgesamt 3 x durchführen. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

6. 100 µl verdünnte SA-POD Lösung in jede Vertiefung (außer Blank). pipettieren. Mikrotiterstreifen abdecken und für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei mittlerer Schüttelgeschwindigkeit (ca. 500 Bewegungen pro Min) inkubieren.
7. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünnter Waschlösung füllen, und wieder entleeren. Diesen Vorgang insgesamt 3 x durchführen. Um restlichen Schaum zu entfernen, in einem letzten Waschschrift dest. Wasser verwenden. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.
8. 100 µl Substratlösung (TMB) in jede Vertiefung pipettieren (inkl. Blank) und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen **ohne Schütteln** inkubieren.
9. Je 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung (inkl. Blank) pipettieren und für 5 Sekunden auf dem Schüttler mischen.
10. Streifen innerhalb von 30 Minuten im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Meßwellenlänge von 405 nm und anschließend bei 450 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.

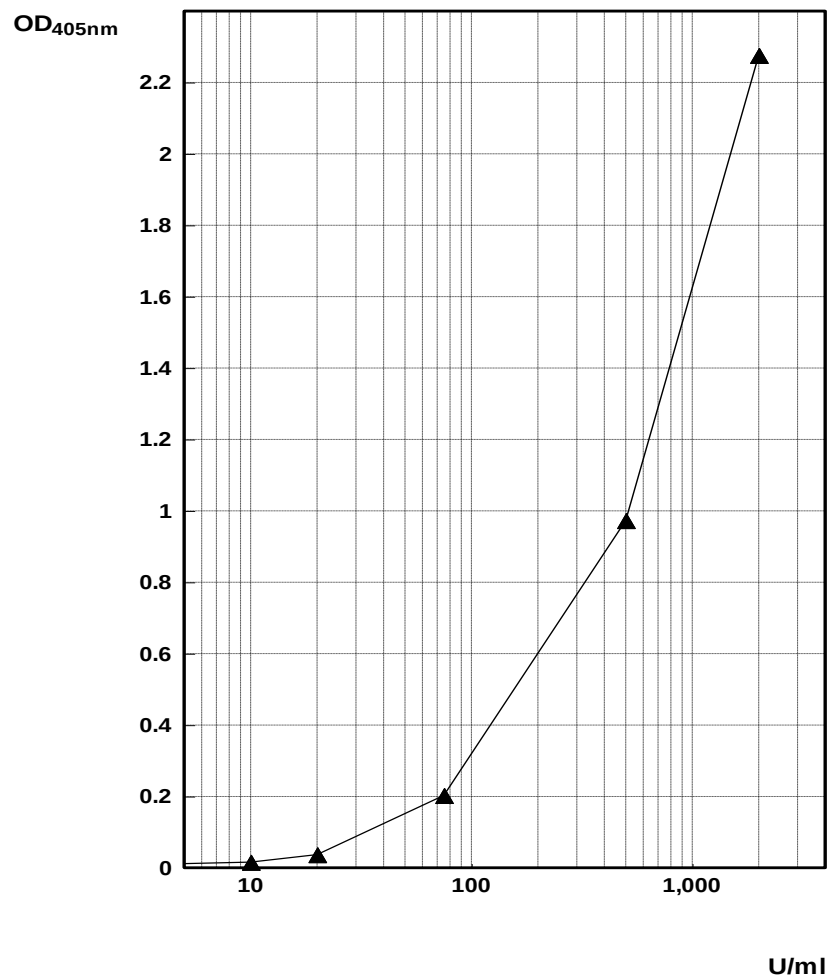
Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen. Alternativ kann auch die Cubic-Spline-Methode oder die Logit-Log-Berechnung verwendet werden.

Patientenproben mit hohen ZnT8 Autoantikörperkonzentrationen können mit der Negativkontrolle, das keine ZnT8 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 405 nm	OD 450 nm	U/ml
Negative Kontrolle	0,002	0,008	0
Standard A	0,016	0,060	10
Standard B	0,037	0,134	20
Standard C	0,203	0,673	75
Standard D	0,973	3,222	500
Standard E	2,276	7,738	2.000
Positive Kontrolle I	0,137	0,463	60
Positive Kontrolle II	0,477	1,596	134



9. Klinische Evaluierungsdaten

Klinische Evaluierung

In der IASP Studie 2015 erreichte der ZnT8 Autoantikörper ELISA eine Spezifität von 97% (n=90) und eine Sensitivität von 76% (n=50).

Die Messung von 297 Seren gesunder Blutspender ergab einen Mittelwert von $1,9 \pm 3,84$ U/ml. Drei Seren (1%) lagen über dem Referenzbereich mit Werten von 45, 41 und 19 U/ml.

10. Referenzbereich

Negativ	< 15 U/ml
Positiv	≥ 15 U/ml

11. Literatur

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

Pipettierschema

	B ₀	Standard A - E	Positive Kontrollen I/II	Patienten -serum
Negative Kontrolle µl	25			
Standard A-E µl		25		
Positive Kontrollen µl			25	
Patientenserum µl				25

Über Nacht 16-18 Std. bei 2-8 °C inkubieren

entleeren, 3 x waschen mit 300 µl Waschpuffer

kaltetes ZnT8-Biotin µl	100	100	100	100
--------------------------------	-----	-----	-----	-----

1 Stunde bei 2-8 °C ohne Schütteln inkubieren

entleeren, 3 x waschen mit 300 µl Waschpuffer

SA-POD µl	100	100	100	100
-----------	-----	-----	-----	-----

20 Minuten bei Raumtemperatur auf Schüttler (500 rpm) inkubieren

entleeren, 3 x mit 300 µl Waschpuffer, 1x mit dest Wasser waschen

TMB-Substrat µl	100	100	100	100
-----------------	-----	-----	-----	-----

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

Stopplösung µl	100	100	100	100
----------------	-----	-----	-----	-----

5 Sekunden schütteln

Messung der Extinktion bei 405nm / 450 nm innerhalb 30 Minuten