





Arbeitsanleitung

Anti - Titin - Antikörper - ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von anti-Titin-Antikörpern in Serum und Plasma

REF EA601/48

 6 x 8

 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

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. Vorbereitung der Reagenzien und Proben	Seite	7
6. Testdurchführung	Seite	8
7. Auswertung und Interpretation der Ergebnisse	Seite	9
8. Literatur	Seite	11
Pipettierschema	Seite	12

1. Klinische Bedeutung und Testprinzip

Bei Patienten, die an Myasthenia gravis leiden, findet man in 80 % der Fälle Veränderungen des Thymus, bei ca. 10 % entwickelt sich die Thymusneoplasie in Form eines epithelialen Thymoms (TET, Thymuskarzinom). Die möglichst frühe Diagnose des Thymoms und die anschließende Thymektomie ist entscheidend für die Prognose dieser Patienten.

Die meisten dieser Patienten entwickeln neben den gut nachzuweisenden Acetylcholinrezeptor-Antikörpern zur Diagnose einer Myasthenia gravis (ACHRAB®-Assay), weitere Autoantikörper gegen die quergestreifte Muskulatur, unter anderem auch Antikörper gegen Titin.

Titin ist ein Protein der quergestreiften Muskulatur mit extrem großem Molekulargewicht. Die immunogenen Regionen des Titins liegen auf einem 30 kD Protein-Fragment und lassen eine Kreuzreaktivität mit den Epitopen der Acetylcholinrezeptoren vermuten (paraneoplastische Myasthenia gravis). Das rekombinant hergestellte MGT30 Peptid wird für den ELISA zum spezifischen Nachweis der anti-Titin-Antikörper eingesetzt.

Der neue ELISA-Test ist dem Immunfluoreszenz-Test (IFT) auf Schnitten quergestreifter Muskulatur (Human, Affe) deutlich überlegen.

Der Anti-Titin-ELISA ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay. Während der Probeninkubation binden anti-Titin-Antikörper aus den verdünnten Patientenproben und Standards an rekombinantes Titin-Fragment (MGT30-Peptid), das auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten-Vertiefungen immobilisiert ist.

Nach einem Waschschrift wird Peroxidase-markiertes Protein A zugesetzt, das an die anti-Titin-Antikörper bindet. Nach einem weiteren Waschschrift wird die gebundene Enzymmenge über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Dabei entsteht zunächst ein blauer Farbstoff. Der Zusatz von Schwefelsäure stoppt diese Nachweisreaktion und bewirkt einen Farbumschlag nach Gelb.

Die Extinktionen der Proben werden dann mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gemessen und mit Hilfe des im Test eingesetzten Kalibrators ausgewertet.

2. Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch für Forschungszwecke 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.

Alle Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

4. Inhalt des Testbestecks

- | | | |
|-----|---|--------------|
| 4.1 | MT-Streifen STRIPS | 6 Stück |
| | Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar
beschichtet mit rekombinantem MGT30-Peptid | |
| 4.2 | Enzymkonjugat CONJ | 1 Fläschchen |
| | 6 ml, gebrauchsfertig
Protein-A konjugiert an Peroxidase | |
| 4.3 | Kalibrator CAL | 1 Fläschchen |
| | 1 ml Serum, gebrauchsfertig (1:101 vorverdünnt) | |
| 4.4 | Negativ-Kontrolle CON - | 1 Fläschchen |
| | 1 ml Serum, gebrauchsfertig (1:101 vorverdünnt) | |
| 4.5 | Positive Kontrolle CON + | 1 Fläschchen |
| | 1 ml Serum, gebrauchsfertig (1:101 vorverdünnt) | |
| 4.6 | Probenverdünnungspuffer DIL | 1 Flasche |
| | 55 ml, gebrauchsfertig | |
| 4.7 | Waschpuffer WASH | 1 Flasche |
| | 50 ml, Konzentrat
Inhalt mit bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen. | |
| 4.8 | Substrat SUB | 1 Fläschchen |
| | 6 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig | |
| 4.9 | Stopplösung STOPP | 1 Fläschchen |
| | 6 ml, gebrauchsfertig
Enthält 0,3M Schwefelsäure
Vorsicht, ätzend! | |

Zusätzlich benötigte Materialien und nützliche Hilfsmittel

- Variable Präzisionspipetten mit auswechselbaren Spitzen (10, 100 µl)
- Multipette (Eppendorf) mit auswechselbaren Aufsätzen für unterschiedliche Volumina
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten

5. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

5.1 Patientenproben

Es sollten frische Proben eingesetzt werden. Falls notwendig, können Serum- bzw. Plasmaproben bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren soll vermieden werden. Hämolytische Proben sollten nicht verwendet werden.

Die Patientenproben müssen für die Messung 1:101 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt werden (z.B. 10 µl Probe + 1.000 µl Puffer). Verdünnte Proben, die für eine eventuelle Wiederholungsmessung aufbewahrt werden sollen, müssen ebenfalls eingefroren werden.

5.2 MT-Streifen STRIPS

Mikrotiterstreifen im geschlossenen Folienbeutel in etwa 10 Minuten auf Raumtemperatur bringen. Die nicht benötigten Mikrotiterstreifen dem Halterahmen entnehmen, wieder in den Beutel legen (das Trockenmittel im Beutel belassen) und diesen **sorgfältig** verschließen.

5.3 Waschpuffer WASH

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen. Der fertige Waschpuffer muß bei 2 - 8 °C gelagert werden und ist dann mindestens 2 Monate haltbar.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6. Testdurchführung

6.1 Proben-Inkubation

Jeweils 100 µl des gebrauchsfertigen Kalibrators, 100 µl der gebrauchsfertigen Kontrollen und 100 µl der verdünnten Proben (vorzugsweise als Doppelbestimmungen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.

60 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.

6.2 Waschen

Vertiefungen entleeren, mit je ca. 300 µl Waschpuffer füllen, und wieder entleeren. Diesen Vorgang insgesamt 3 - 4 mal durchführen. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

6.3 Konjugat-Inkubation

Jeweils 100 µl Enzymkonjugat in die Vertiefungen pipettieren.

30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.

6.4 Waschen

Wie unter Punkt 6.2 beschrieben.

6.5 Substrat-Inkubation

Jeweils 100 µl Substrat in die Vertiefungen füllen und 15 bis 25 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln.

6.6 Stoppen der Substratinkubation

Jeweils 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen füllen; dabei die gleiche Reihenfolge und den gleichen Zeittakt einhalten wie bei Zugabe der Substratlösung.

6.7 Messung

Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Meßwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) gegen Luft messen. Die Messung sollte innerhalb von 10 Minuten nach dem Abstoppen erfolgen.

7. Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Die gemessene optische Dichte der Proben wird auf die optische Dichte des Kalibrators bezogen und als Faktor F angegeben.

$$\text{Faktor Probe} = \frac{\text{OD Probe}}{\text{OD Kalibrator}}$$

Typisches Beispiel

	OD _{Probe}	$\frac{\text{OD}_{\text{Probe}}}{\text{OD}_{\text{Kalibrator}}}$	Bewertung
Kalibrator	0,766	1,0	
Negativ-Kontrolle	0,126	0,2	-
Positiv-Kontrolle	2,157	2,8	+
Probe 1	0,391	0,5	-
Probe 2	1,498	2,0	+

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Messung von 100 Normalseren aufgeführt. In der folgenden Abbildung ist die Verteilung der Normalwerte dargestellt.

Die Tabelle zeigt außerdem erste Daten von Kontrollgruppen (Patienten mit ANA bzw. TRAK Antikörpern) zur Überprüfung der Spezifität.

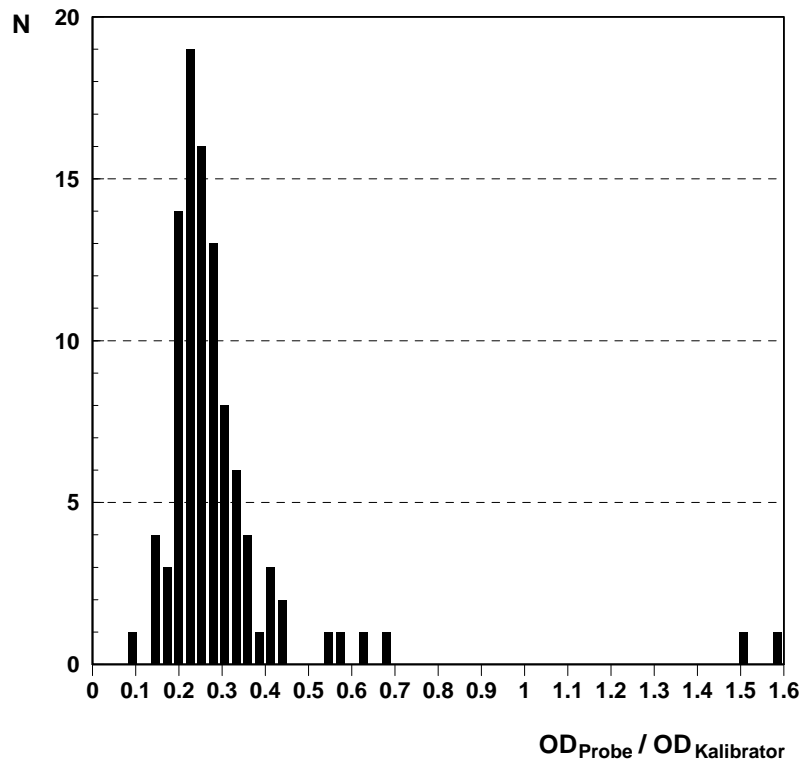
Erste Messungen mit Seren von Thymom-Patienten zeigten Werte von Faktor 2 bis 4.

Als vorläufiger Referenzbereich kann mit den bisher vorliegenden Daten mit <1,0 angegeben werden.

Meßergebnisse

	Normal	ANA+	TRAK+
N	100	12	6
Min	0,09	0,27	0,20
Max	1,60	1,46	0,38
95%-Perzentile	0,54	0,92	0,38
Median	0,25	0,45	0,26

Verteilung der Normalwerte



8. Literatur

- E Lübke, A Freiburg, GO Skeie, B Kolmerer, S Labeit, JA Aarli, NE Gilhus, R Wollmann, M Wussling, JC Ruegg, WA Linke
Striational autoantibodies in myasthenia gravis patients recognize I-band titin epitopes
J Neuroimmunol 1998;81:98-108
- RD Voltz, WC Albrich, A Nägele, F Schumm, M Wick, A Freiburg, M Gautel, HT Thaler, J Aarli, Th Kirchner, R Hohlfeld
Paraneoplastic myasthenia gravis: Detection of anti-MGT30 (titin) antibodies predicts thymic epithelial tumor
Neurology 1997;49:1454-1457
- M Gautel, A Lakey, DP Barlow, Z Holmes, S Scales, K Leonard, S Labeit, A Mygland, NE Gilhus, JA Aarli
Titin antibodies in myasthenia gravis: Identification of a major immunogenic region of titin
Neurology 1993;43:1581-1585

Pipettierschema

Kalibrator	100 µl
Kontrollen (negativ + positiv)	100 µl
Patientenproben 1:101 verdünnt	100 µl



60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur



3 - 4 x Waschen



Enzymkonjugat	100 µl
---------------	--------



30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur



3 - 4 x Waschen



Substrat	100 µl
----------	--------



15 bis 25 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur



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



Messung der Extinktion bei 450 nm