



**Acetylcholine Receptor Autoantibody
(AChRab) RIA 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.comWebsite: www.rsrltd.comAdvena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta.**VERWENDUNGSZWECK**

Das Acetylcholin-Rezeptor-Autoantikörper (AChRab)-Kit von RSR ist zur quantitativen Bestimmung von Acetylcholin-Rezeptor (AChR)-Autoantikörpern (AChR-Ak) in Humanserum und nur für die Verwendung durch Fachpersonal bestimmt. Autoantikörper gegen den AChR sind für die Störung der neuromuskulären Übertragung bei Myasthenia gravis verantwortlich. Die Messung der Antikörper kann bei der Krankheitsdiagnose von beträchtlichem Wert sein.

LITERATURLISTE

K Ohta et al

Frequency of Anti AChR ϵ subunit-specific antibodies in MG.Autoimmunity 2003 36: 151-154

I. Matthews et al

Muscle-specific receptor tyrosine kinase autoantibodies – a new immunoprecipitation assay.

Clinica Chimica Acta 2004 348: 95-99

D. Beeson et al

A transfected human muscle cell line expressing the adult subtype of the human muscle acetylcholine receptor for diagnostic assays in myasthenia gravis.

Neurology 1996 47: 1552-1555**TESTPRINZIP**

Adulte und fetale Formen des Acetylcholinrezeptors unterscheiden sich durch eine ihrer Untereinheiten (die Gamma-Untereinheit im fetalen Rezeptor wird durch die Epsilon-Untereinheit im adulten Rezeptor ersetzt). Darüber hinaus erkennen AChR-Ak in einigen Seren bevorzugt die fötale Form des Rezeptors, während AChR-Ak in anderen Seren bevorzugt die adulte Form des Rezeptors erkennen. Folglich ist eine sorgfältig ausgewogene Mischung aus in Detergens solubilisierten fötalen und adulten Formen des Rezeptors die optimale Vorbereitung für AChRab-Assays. Diese Mischung aus Rezeptoren, markiert mit ¹²⁵I-markiertem Alpha-Bungarotoxin, bildet die Grundlage für das AChRab-Assay-Kit von RSR. In dem Assay werden markierte Rezeptoren (¹²⁵I AChR) mit Testseren inkubiert und jedes Komplex aus ¹²⁵I AChR und AChR-Ak wird mit Anti-

Human-IgG immunpräzipitiert. Nach der Zentrifugation und einem Waschschrift werden die cpm im Niederschlag bestimmt.

AUFBEWAHRUNG UND VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN

Zu analysierende Seren sollten bald nach dem Abseren getestet werden oder, vorzugsweise in Aliquots, bei 2-8°C bis zu einer Woche oder bei -20°C für längere Zeit gelagert werden. Doppelbestimmungen mit je 5 μ L reichen für einen Assay aus. Wiederholtes Einfrieren, Auftauen oder Erhöhungen der Lagertemperatur sind zu vermeiden. Eine unsachgemäße Lagerung der Serumproben kann zum Verlust der Antikörperaktivität führen. Keine lipämischen oder hämolytischen Serumproben verwenden. Plasma kann verwendet werden, wenn EDTA als Antikoagulans verwendet wurde. Falls erforderlich, die Testseren bei Raumtemperatur auftauen lassen und vorsichtig mischen, um Ihre Homogenität zu gewährleisten. Das Serum vor dem Assay zentrifugieren (vorzugsweise für 5 Minuten bei 10-15.000 rpm in einer Mikrozentrifuge), um alle Partikel zu entfernen. Lassen Sie diesen Zentrifugationsschritt bitte nicht aus, sollten die Seren trüb sein oder Partikel enthalten.

SYMBOLE

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

MATERIALIEN ENTHALTEN IN KITS MIT 25 BZW 100 RÖHRCHEN

MATERIAL	RB/25	RB/100
¹²⁵ I AChR	1 x 2,7mL	4 x 2,7mL
Negative Control	1 x 100 μ L	1 x 100 μ L
Positive Controls	2 x 100 μ L	2 x 100 μ L
Anti Human IgG	1 x	1 x

	1,5mL	5,5mL
Normal Human Serum	1 x 1mL	1 x 4mL
Washing Solution	1 x 60mL	2 x 120mL
Reconstitution Buffer	1 x 4mL	4 x 4mL
Calibrators (Optional)	6 x 75µL	6 x 75µL

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

3,5 mL Teströhrchen

Geeignetes Gestell für Teströhrchen

Kalibrierte Pipetten zum Pipettieren von 5 µL, 50 µL, 100 µL und 1 mL

Gekühlte Zentrifuge geeignet für 1500 x g

Vortexmischer

Geeignete Vorrichtung zum Absaugen der Überstände aus den Teströhrchen

Gammazähler

VORBEREITUNG DER MITGELIEFERTEN REAGENZIEN

Das ungeöffnete Kit und alle Kitkomponenten bei 2-8°C lagern.

A	¹²⁵I Labelled AChR Lyophilisiert	75kBq/Fläschchen (bei Herstellung)
	In jedes Fläschchen 2,7 mL Reconstitution Buffer (G) pipettieren und vorsichtig mischen bis sich das Lyophilisat aufgelöst hat. Nach der Rekonstitution bei 2–8°C bis zu 2 Wochen haltbar. Unmittelbar vor Verwendung gründlich mischen.	
B	Negative Control	Gebrauchsfertig
C1-2	Positive Controls I & II (s. QC Zertifikat für Konzentrationsbereiche)	Gebrauchsfertig
D	Anti Human IgG	Gebrauchsfertig
E	Normal Human Serum	Gebrauchsfertig
F	Wash Solution	Gebrauchsfertig
G	Reconstitution Buffer	Gebrauchsfertig
H	Calibrators (Optional)	0; 0,25; 0,5; 2,0; 4,0; 8,0 nmol/L Gebrauchsfertig

TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien, mit Ausnahme der Wash Solution, vor Beginn des Assays mindestens 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen. Ein Mehrfachdispenser (z. B. Eppendorf Multipette®) wird für die Schritte 2, 5, 8 und 11 empfohlen.

1	Jeweils 5 µL der Kit Controls (B, C1-2), Patientenserum (unverdünnt) und, falls verwendet, Calibrators (H; optional) in beschriftete Teströhrchen, in möglichst zweifacher Ausführung, pipettieren (kalibrierte Pipetten verbessern die Inter-Assay Präzision). Hinweis: Bei Verwendung der Calibrators kann die Negative Control weggelassen werden.
----------	---

2	Jeweils 100 µL ¹²⁵ I AChR (A) in jedes Röhrchen pipettieren.
3	Jeweils Röhrcheninhalt mit einem Vortexmischer mischen und die Röhrchen mit einem geeigneten Deckel verschließen.
4	Für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren. Während dieser Inkubation bei 2 Röhrchen 3 Sekunden lang die cpm messen, um die Totalaktivität zu bestimmen.
5	Jeweils 50 µL Anti-Human-IgG (D) in jedes Röhrchen pipettieren.
6	Schritt 3 wiederholen.
7	Für 2 Stunden bei 2–8°C inkubieren.
8	Jeweils 1 mL kalte Wash Solution (F) in jedes Röhrchen pipettieren und den Inhalt mit einem Vortexmischer mischen.
9	Jedes Röhrchen für 20 Minuten bei 1500 x g und 2–8°C zentrifugieren.
10	Den Überstand absaugen oder dekantieren.
11	Jeweils 1 mL kalte Wash Solution (F) in jedes Röhrchen pipettieren und das Pellet vorsichtig mit einem Vortexmischer resuspendieren.
12	Zentrifugationsschritt 9 wiederholen.
13	Den Überstand absaugen oder dekantieren.
14	Bei allen Röhrchen mit einem Gammazähler die cpm des ¹²⁵ I für 2 Minuten bestimmen.

TESTAUSWERTUNG

Die Radioaktivität im endgültigen Pellet ist proportional zur Menge an markiertem AChR, das durch die AChR-Ak gebunden wird. Dies kann, unter Verwendung der folgenden Gleichung, als nmol markiertes AChR gebunden pro Liter Testserum ausgedrückt werden:

nmol/L AChR gebunden =

$$\frac{(\text{cpm Probe} - \text{cpm Negative Control}) \times A}{C \times K \times B \times 2,22}$$

wobei;

A Zerfallfaktor für ¹²⁵I zwischen dem Tag der Markierung des Rezeptors und dem Tag der Durchführung des Assays; **B** Zähleffizienz des Gammazählers; **C** Volumen des verwendeten Serums (µL) und **K** Spezifische Aktivität (Ci/mmol) des ¹²⁵I-markierten Toxins zum Zeitpunkt der Herstellung des ¹²⁵I AChR. Werte für A, C und K befinden sich auf dem im Kit beigelegten QC Zertifikat.

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

Totalaktivität 133.590	Mittelwert	Konz.
Testproben	cpm im Pellet	nmol/L
Kit Negative Control (B)	1877	
Kit Positive Control (CI)	3565	0,94
Kit Positive Control (CII)	8000	3,4
Patientenserum 1	6012	2,3
Patientenserum 2	2818	0,53
Patientenserum 3	16134	8,0

Beispielberechnung

Wenn die Testprobe 3565 cpm ergibt und die Negative Control 1877 cpm, wobei der Assay mit 5 µL Testserum bis zu 1 Woche nach dem Markierungsdatum durchgeführt wurde, unter Verwendung eines Toxins mit einer spezifischen Aktivität von 223 Ci/mmol und eines Gammazählers mit einer Zähleffizienz von 0,723, dann ist $A = 1,0$, $B = 0,723$, $C = 5$ und $K = 223$.

$$\text{AChRAb Konz.} = \frac{(3565 - 1877) \times 1,0}{5 \times 223 \times 0,723 \times 2,22} = 0,94 \text{ nmol/L}$$

Assay Calibrators

Als Alternative zur Verwendung der oben beschriebenen Berechnung kann eine Reihe von Calibrators (0; 0,25; 0,5; 2; 4 und 8 nmol/L) in jedem Assay mitgeführt werden. Eine Kalibrierkurve kann erstellt werden, indem die gemittelten cpm jedes Calibrators (y-Achse, logarithmisch) gegen seine entsprechende Konzentration (x-Achse, logarithmisch) aufgetragen werden. An der Kalibrationskurve können dann die AChR-Ak-Konzentrationen in Patientenseren und Controls abgelesen werden.

Alternativ kann eine Kalibrierungskurve erstellt werden, indem die Konzentrationen der Calibrators auf der x-Achse (logarithmische Skala) gegen die prozentuale Bindung der Calibrators ($\text{cpm}_{\text{Calibrator}} / \text{cpm}_{\text{Totalaktivität}} \times 100$) auf der y-Achse (lineare Skala) aufgetragen wird. Die AChR-Ak-Konzentrationen der Proben und Controls können dann über ihre jeweilige prozentuale Bindung ($\text{cpm}_{\text{Control ODER Probe}} / \text{cpm}_{\text{Totalaktivität}} \times 100$) direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Linearität des Assays

Die Beziehung zwischen der Acetylcholinrezeptor-Antikörperkonzentration und den im Assay gebundenen cpm ist nur über einen begrenzten Bereich linear. Um dieses Problem zu überwinden, können Antikörper-positive Seren mehrmals in dem bereitgestellten Normal Human Serum (E) verdünnt und getestet werden. Antikörperkonzentrationen können dann unter Verwendung von Werten innerhalb des linearen Bereichs berechnet werden. Der lineare Bereich für verschiedene (unverdünnte) Patientenseren ist meist unterschiedlich, jedoch sind 0,5 – 5 nmol/L eine nützliche Orientierungshilfe. Betrachten wir zum Beispiel eine Testserumprobe, die unverdünnt einen Wert von 9 nmol/L ergibt. Dreifache, neunfache und 27fache Verdünnungen ergeben Werte von 12, 13 bzw. 13 nmol/L (nach Einbeziehen des Verdünnungsfaktors), wobei alle 3 Werte offensichtlich im linearen Bereich liegen, da sie gut übereinstimmen. Das Ergebnis für diese Probe wird dann als Mittelwert dieser 3 Werte ausgedrückt, d. h. 12,7 nmol/L.

ASSAY CUT-OFF

Cut-off	nmol/L
Negative	< 0,5 nmol/L
Positive	≥ 0,5 nmol/L

Dieser Cut-off wurde bei RSR validiert. Jedoch sollte jedes Labor seinen eigenen normal und pathologische Referenzbereiche für AChRAb-Spiegel festlegen.

KLINISCHE BEWERTUNG

Klinische Spezifität

112 Proben von gesunden Blutspendern wurden im AChRAb RIA getestet. 110 (98 %) wurden als AChR-Ak-negativ identifiziert.

Klinische Sensitivität

Proben von 53 Patienten mit diagnostizierter Myasthenia gravis wurden im AChRAb RIA getestet und alle 53 wurden als positiv für AChR-Ak identifiziert. In einer größeren Serie stellten K. Ohta et al. (Autoimmunity 2003 36 151–154) fest, dass 82% von 1740 Patienten mit Myasthenia gravis unter Verwendung des RSR AChRAb-Kits AChR-Ak-positiv waren.

Untere Nachweisgrenze

Die Negative Control des AChRAb-RIA-Kits wurde 20 Mal getestet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze bei +2 Standardabweichungen betrug 0,02 nmol/L.

Inter-Assay Präzision

Probe	Mittelwert nmol/L (n = 21)	VK (%)
1	2,2	5,0
2	0,5	5,9

Intra-Assay Präzision

Probe	Mittelwert nmol/L (n = 20)	VK (%)
1	3,3	1,9
2	1,8	1,7

Klinische Genauigkeit

Mit dem AChRAb-Kit wurde keine Interferenz durch Autoantikörpern gegen TSH-Rezeptor, Thyreoglobulin, Schilddrüsenperoxidase, GAD, 21-OH, doppelsträngige DNA oder Rheumafaktor festgestellt.

Interferenzen

Es wurde keine Interferenz beobachtet, wenn Proben mit den folgenden Materialien versetzt wurden; Hämoglobin bis zu 5 mg/mL, 20 mg/dL Bilirubin oder Intralipid bis zu 30 mg/dL.

Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen Daten sollten nur als Richtlinie dienen. Es wird empfohlen, dass jedes Labor sein eigenes Panel an Kontrollproben in den Assay einbezieht. Jedes Labor sollte seine eigenen normalen und pathologischen Referenzbereiche für AChRAb-Spiegel festlegen.

SICHERHEITSHINWEISE

Befolgen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig. Beachten Sie die auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten und die angegebenen Haltbarkeiten für rekonstituierte Reagenzien. Ausführlichere Sicherheitsinformationen finden Sie im Materialsicherheitsdatenblatt. Das Kit enthält radioaktives Material. Benutzer sollten sich über alle nationalen und lokalen Gesetze und Verhaltenskodizes in Bezug auf die Verwendung, Lagerung, den Transport und die Entsorgung radioaktiver Materialien informieren und diese beachten. Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einer Einnahme führen könnten. Kontakt mit Haut und Kleidung vermeiden. Schutzkleidung und gegebenenfalls Personendosimeter tragen. Radioaktive Materialien sollten nur von autorisiertem Personal und in ausgewiesenen Bereichen verwendet werden. Nach der Handhabung Hände gründlich waschen. Messen Sie Hände und Kleidung auf eine eventuelle Kontamination, bevor Sie den ausgewiesenen Bereich verlassen.

Materialien menschlichen Ursprungs, die bei der Herstellung des Kits verwendet wurden, wurden getestet und als nicht reaktiv auf HIV1- und 2- und HCV-Antikörper und HBsAg befunden, sollten 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, einschließlich Testproben, vor der Entsorgung. Das bei der Herstellung des Kits verwendeten Materialien tierischen Ursprungs stammen 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 bei allen Kit-Komponenten das Verschlucken, Einatmen, Injizieren und den Kontakt mit Haut, Augen und Kleidung. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie bei allen Kit-Komponenten mit reichlich Wasser nachspülen.

ASSAY PLAN

Alle Reagenzien (außer Wash Solution) und Proben vor Verwendung auf Raumtemperatur (20–25 °C) bringen.	
Pipettieren:	5 µL der Kit Controls (B, C1-2), Patientenseren (unverdünnt) und, falls verwendet, Calibrators (H; optional, Negative Control kann weggelassen werden)
Pipettieren:	100 µL ¹²⁵ I AChR (A)
Röhrchen:	Auf Vortexmischer mischen und abdecken
Inkubieren:	2 Stunden bei Raumtemperatur. Bei 2 Röhrchen für 3 Sekunden die cpm für die Totalaktivität bestimmen.
Pipettieren:	50 µL Anti Human IgG (D) in jedes Röhrchen
Röhrchen:	Auf Vortexmischer mischen und abdecken
Inkubieren:	2 Stunden bei 2–8°C
Pipettieren:	1 mL kalte Wash Solution (F)
Röhrchen:	Auf Vortexmischer mischen und abdecken
Röhrchen:	Für 20 Minuten bei 2–8°C und 1500 x g zentrifugieren
Röhrchen:	Überstand absaugen/dekantieren
Pipettieren:	1 mL kalte Wash Solution (F)
Röhrchen:	Auf Vortexmischer mischen, um Pellet zu resuspendieren
Röhrchen:	Für 20 Minuten bei 2–8°C und 1500 x g zentrifugieren
Röhrchen:	Überstand absaugen/dekantieren
Bei jedem Röhrchen 2 Minuten lang die cpm des ¹²⁵ I mit einem Gammazähler bestimmen.	