







Arbeitsanleitung

Canine ACHRAB[®] RIA

¹²⁵I-Radioimmunoassay für die
quantitative Bestimmung von
**Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern in
Serum von Hunden**

Nur für veterinärmedizinische Diagnostik









	RA119/25
	25
	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.....	4
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	5
3	Lagerung und Stabilität der Reagenzien	5
4	Inhalt des Testbestecks	6
5	Probengewinnung und Aufbewahrung.....	7
6	Assayvorbereitung	7
7	Testdurchführung.....	8
8	Testauswertung	9
9	Klinische Evaluierung.....	11
10	Literatur	11
11	Am Kit vorgenommen Änderungen.....	11
	Pipettierschema	12

Verwendete Symbole

	Inhalt		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole



radioaktiv



Gefahr

1 Klinische Bedeutung und Testprinzip

Bei der Myasthenia gravis verursachen Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor der motorischen Endplatte eine Störung der neuromuskulären Übertragung. Klinisch zeigt sich eine Schwäche und abnorme Ermüdbarkeit der Skelettmuskulatur.

Der Canine ACHRAB® RIA Assay verwendet rekombinante hunde-spezifische Acetylcholinrezeptoren als Antigen. Die Rezeptoren sind mit ^{125}I -alpha-Bungarotoxin, einem Schlangengift, das hochspezifisch und fast irreversibel an den Rezeptor bindet, radioaktiv markiert. Die in dem Patientenserum vorhandene Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper (cACHRAB) binden an den ^{125}I -markierten Rezeptor. Der Antikörper-Rezeptor-Komplex wird mit einem anti-IgG-Antikörper ausgefällt. Die im Präzipitat gemessene Radioaktivität ist ein Maß für die Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper-Konzentration im Serum.

2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen



- Dieser Kit ist lediglich für die veterinärmedizinische Diagnostik bestimmt.
- Die angegebenen Verfallsdaten sind unbedingt zu beachten.
- Die Reagenzien bis zur Verwendung bei 2 - 8 °C lagern.
- Einige der Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. Verschlucken und Berührung mit der Haut vermeiden.
- Für den Umgang mit radioaktiven Stoffen gelten die Vorschriften der gültigen Strahlenschutzverordnung. Folgende Vorsichtsmaßnahmen sind unbedingt einzuhalten:
 - Beim Umgang mit radioaktiven Stoffen nicht essen, trinken und rauchen. Radioaktives Material niemals mit dem Mund pipettieren.
 - Einmalhandschuhe verwenden. Verschüttetes radioaktives Material sofort abwischen, kontaminierte Flächen oder Gegenstände mit geeigneten Detergenzien reinigen.
 - Fester und flüssiger Abfall sind gemäß StrSchV zu behandeln.
 - Radioaktive Reagenzien dürfen nur an Personen abgegeben werden, die im Besitz einer gültigen Umgangsgenehmigung sind.
 - 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 einer 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 nur Reagenzien einer Charge verwenden.

4 Inhalt des Testbestecks

¹²⁵I-ACHRAB® -Rezeptor	TRACER	2 Flaschen
Aktivität ~ 20 kBq je Flasche Lyophilisat		
¹²⁵ I-alpha-Bungarotoxin markierter hunde-spezifischer Acetylcholinrezeptor		 radioaktiv
Nach dem Auflösen ist d. Rezeptor sofort zu verwenden		
Negativ Kontrolle	CON -	1 Flasche
0,1 ml, gebrauchsfertig		
Positiv Kontrolle	CON +	1 Flasche
0,1 ml, gebrauchsfertig		
Anti-IgG-Ak	ANTI - IGG	1 Flasche
1,5 ml, gebrauchsfertig		
Waschlösung	WASH	1 Flasche
60 ml, gebrauchsfertig, bei 2-8°C lagern und kalt verwenden		
Präzipitationsverstärker	ENHANCER	1 Flasche
1 ml, gebrauchsfertig, vor Gebrauch gut durchmischen		 Gefahr
Rekonstitutionspuffer	BUFFER	1 Flasche
4 ml, gebrauchsfertig, zum Rekonstituieren der ¹²⁵ I-ACHRAB® -Rezeptor Lyophilisats		
Normalserum	SERUM	1 Flasche
1 ml, gebrauchsfertig		

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten u. Pipettenspitzen zum Dispensieren von 5, 25, 50, 750 µl & 1 ml
- 3,5 ml Polystyrol-Rundboden-Röhrchen und passendes Gestell
- Zentrifuge kühlbar auf 2-8°C mit 1.500 x g
- Absaugvorrichtung
- Vortex-Mischer
- Gamma-Counter

5 Probengewinnung und Aufbewahrung

Für den Test muss Serum eingesetzt werden. Hämolytische bzw. lipämische Proben dürfen nicht verwendet werden. Die Proben können, vorzugsweise aliquotiert, eingefroren bei -20°C für einen längeren Zeitraum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben vermeiden.

6 Assayvorbereitung

6.1 Patientenproben

Vor Gebrauch die Serumproben bei Raumtemperatur auftauen lassen, vorsichtig mischen und zentrifugieren (5min bei 10.000 rpm oder 10.000g in einer Mikrofuge), um Schwebeteilchen zu entfernen. Wird ein Patientenserum erstmals getestet, sollten 5 µl des Serums unverdünnt eingesetzt werden.

6.2 Verdünnung der Patientenseren

Wird ein Patientenserum erstmals getestet, sollten 5 µl des Serums unverdünnt eingesetzt werden. Falls notwendig (siehe Linearitätsbereich), müssen Patientenseren verdünnt eingesetzt werden. Es empfiehlt sich, feste Verdünnungsstufen einzuhalten. Die Patientenseren dürfen nur mit dem im Kit mitgelieferten Normalserum [SERUM] verdünnt werden. Bei Verwendung anderer Verdünnungsmedien kann es zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen.

6.3 Auflösen des ¹²⁵I-ACHRAB® -Rezeptor

Kurz vor Gebrauch wird der ¹²⁵I-ACHRAB®-Rezeptor Lyophilisat [TRACER] je Fläschchen mit 0,75ml Rekonstitutionspuffer [BUFFER] aufgelöst. Das Fläschchen wird anschließend leicht geschwenkt, bis sich eine homogene, leicht trübe Lösung gebildet hat. Ein (zwei) Fläschchen reicht für die Messung der Positiv Kontrolle, Negativ Kontrolle und 5 (12) Proben jeweils in Doppelbestimmung. Bei Verwendung von 2 Fläschchen diese poolen. Der angesetzte Tracer muss zeitnah verwendet werden und ist nicht haltbar.

7 Testdurchführung

Alle Kitkomponenten, außer der Waschlösung [WASH], für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur bringen.

1. Pro beschriftetes Polystyrol-Röhrchen, 5 µl Positiv Kontrolle [CON +], 5µl Negativ Kontrolle [CON -] und 5 µl Patientenserum (jeweils in Doppelbestimmung) pipettieren. Die Kontrollen bei jedem Testlauf mitführen.
2. Pro Röhrchen 50 µl frisch angesetzten ¹²⁵I-ACHRAB®-Rezeptor [TRACER] pipettieren. Vorsichtig auf einem Vortexer mischen. Für die Bestimmung und Dokumentation der Totalaktivität, drei Röhrchen im Gamma-Counter messen. Die Röhrchen mit einem geeigneten Deckel verschließen. Für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Pro Röhrchen 50 µl Anti-IgG [ANTI-IGG] pipettieren. Vorsichtig auf einem Vortexer mischen. Die Röhrchen mit einem geeigneten Deckel verschließen. Für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Pro Röhrchen 25 µl Präzipitationsverstärker [ENHANCER] pipettieren.
5. Pro Röhrchen 1 ml kalte (2-8°C) Waschlösung [WASH] pipettieren. Vorsichtig auf einem Vortexer mischen.
6. Die Röhrchen für 20 Minuten bei 1.500 x g und 2-8°C zentrifugieren.
7. Den Überstand aus den Röhrchen vorsichtig absaugen oder dekantieren.
8. Pro Röhrchen 1 ml kalte (2-8°C) Waschlösung [WASH] pipettieren. Das Pellet durch vorsichtiges Vortexen resuspendieren.
9. Die Röhrchen für 20 Minuten bei 1.500 x g und 2-8°C zentrifugieren.
10. Den Überstand aus den Röhrchen vorsichtig absaugen oder dekantieren.
11. Die ¹²⁵I-Aktivität in den Röhrchen 2 Minuten lang im Gamma-Counter messen.

8 Testauswertung

Die im Pellet gemessene Radioaktivität repräsentiert die Menge an ^{125}I -markierten Canine Acetylcholinrezeptoren (cAChR), an die die Acetylcholinrezeptor-Antikörper (cACHRAB) aus dem Patientenserum gebunden haben. Die Konzentration an cACHRAB wird als Nanomol gebundener ^{125}I -markierter cAChR pro Liter Serum (nmol/L cAChR gebunden) angegeben und berechnet sich wie folgt:

$$(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Negativ-Kontrolle}}) \times D$$

$$C \times \text{spez. Aktivität} \times Z \times 2,22$$

cpm	=	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
D	=	Faktor für Zerfall nach Markierung. Kann der Tabelle auf dem QC-Zertifikat entnommen werden.
C	=	Serumvolumen in μl
spez. Aktivität	=	in Ci/mmol. Kann dem QC-Zertifikat entnommen werden
Z	=	Zählrohr des Gamma-Counters (z.B. 70%: Z = 0,7)
2,22	=	Umrechnungskonstante von Zerfällen in Curie (Ci)

Der Nenner kann als Konstante K zusammengefaßt werden. K ist so berechnet, dass die Ergebnisse in nmol/l erhalten werden.

K ist chargenspezifisch und kann dem beigelegten Zertifikat entnommen werden.

Somit vereinfacht sich die Formel auf:

$$\text{Konzentration ACHRAB} = (\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Neg. Kontrolle}}) \times D \times K$$

Sollte die Zählrohr des verwendeten Gamma-Counters von dem auf dem Zertifikat angegebenen Wert abweichen, muss K entsprechend neu berechnet werden.

Sollte die Probe mit Normalserum verdünnt worden sein, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

Berechnungsbeispiel:

Der Faktor K sei $0,33 \times 10^{-3}$ nmol/l, D sei 1,22 (2. - 3. Woche; die Werte für D finden sich in dem jedem Kit beigefügten QC-Datenblatt), so dass sich für unverdünnte Seren die Rechenkonstante zu $0,40 \times 10^{-3}$ nmol/l ergibt.

Probe	Mittelwert cpm	Mittelwert cpm – cpm Neg. Kontr.	Konzentration ACHRAB in nmol/l
Negativ Kontrolle	454	0	0
Patientenserum 1 (unverdünnt)	3.291	2.837	1,1

Typische Werte (Beispiel, nicht als Berechnungsgrundlage verwenden)

	cpm	Konzentration ACHRAB in nmol/l
Negativ Kontrolle	1004	0,0
Positiv Kontrolle	7.688	4,1

Cut Off

Negativ Kontrolle	< 1,0 nmol/l
Positiv Kontrolle	≥ 1,0 nmol/l

Der angegebene Cut Off gilt lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche (gesund und pathologisch) erstellt. Darüber hinaus wird empfohlen, dass jedes Labor sich verschiedene Serumproben als ein eigenes Referenz-Panel erstellt.

Linearitätsbereich

Jedes positive Patientenserum zeigt beim Verdünnen mit Normalserum einen linearen Bereich. Je höher die Konzentration der Autoantikörper in den Proben ist, desto eher kommt man in einen nichtlinearen Plateau-Bereich. Eine quantitative Bestimmung der ACHRAB-Antikörper ist aber nur im linearen Bereich sinnvoll. Ein Ablesen außerhalb des linearen Bereichs führt zu falsch niedrigen Werten.

Sowohl der lineare Bereich als auch der Plateau-Bereich ist von Patientenserum zu Patientenserum unterschiedlich. Dieser Bereich muss

deshalb für jedes positive Serum durch verschiedene Verdünnungen mit Normalserum ausgetestet werden. Ein Abschätzen der geeigneten Verdünnung ist in der Verlaufskontrolle durch Kenntnisse der Vorwerte möglich.

Der Verdünnungsfaktor muss entsprechend im Endergebnis einberechnet werden.

9 Klinische Evaluierung

9.1 Klinische Spezifität

Seren von 24 gesunden Hunden wurden im Canine ACHRAB® RIA getestet. 23 (96%) wurden als negativ für Canine AChR Autoantikörper identifiziert.

9.2 Klinische Sensitivität

Seren von 4 Hunden diagnostiziert mit Myasthenia gravis wurden im Canine ACHRAB® RIA getestet. Alle 4 wurden als positiv für Canine AChR Autoantikörper identifiziert.

10 Literatur

- C.W. Dewey et al.
Clinical Forms of Acquired Myasthenia Gravis in Dogs: 25 Cases (1988-1995)
J. of Veterinary Internal Medicine (1997) 11:50-57
- G.D. Shelton et al.
Acquired Myasthenia Gravis. Selective Involvement of Esophageal, Pharyngeal and Facial Muscles.
J. of Veterinary Internal Medicine (1990) 4:281-284

11 Änderungen

Die Arbeitsanleitung wurde neu formatiert und um den Absatz „Sollte die Zählflasche [...]“ auf Seite 9 ergänzt.

Es wurden keine Änderungen an den Kitbestandteilen oder an der Durchführung vorgenommen.

Pipettierschema

Komponenten (außer [WASH]) und Patientenproben vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung messen.

		Negativ Kontrolle	Positiv Kontrolle	Probe
[CON -]	µl	5		
[CON +]	µl		5	
Patientenserum	µl			5

[TRACER]	µl	50	50	50
----------	----	----	----	----

Vorsichtig mischen (Vortex) und verschlossen 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.

[ANTI-IGG]	µl	50	50	50
------------	----	----	----	----

Sorgfältig mischen (Vortex) und verschlossen 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren. Mit drei Röhrrchen Totalaktivität im Gamma-Counter bestimmen und dokumentieren.

[ENHANCER]	µl	25	25	25
------------	----	----	----	----

[WASH] kalt	ml	1	1	1
-------------	----	---	---	---

20 Minuten bei 1.500 x g und 2-8°C zentrifugieren.
Überstand absaugen oder vorsichtig dekantieren.

[WASH] kalt	ml	1	1	1
-------------	----	---	---	---

Pellet durch vorsichtiges Mischen (Vortex) resuspendieren.
20 Minuten bei 1.500 x g und 2-8°C zentrifugieren.
Überstand absaugen oder vorsichtig dekantieren.
Röhrrchen 2 Minuten im Gamma-Counter messen.