DIAGNOSTIKA GMBH

Arbeitsanleitung

ACHRAB® Ganglionic Assay RIA

^{125}I-Radioimmunoassay
zur Quantitativen Bestimmung von
Ganglionären Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern
in humanem Serum

RUO

Art. Nr.	RA122/25
Σ	25
+2 +8 °C	2 – 8 °C

RSR Ltd., Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff, CF14 5DU (UK)
Distributor: 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

Inhaltsangabe

1. Einleitung und Prinzip des Tests 3
2. Vorsichtsmaßnahmen 3
3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien 4
4. Inhalt des Kits 5
5. Probengewinnung und Aufbewahrung 6
6. Vorbereitung der Proben und Reagenzien 6
7. Testdurchführung 7
8. Testauswertung 8
9. Assay Eigenschaften 10
10. Vorgenommene Änderungen 11
11. Literatur 11
Pipettierschema 12

Verwendete Symbole

RUO	Research Use Only Nur für Forschungszwecke		
CONT	Inhalt		Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung		Lagertemperatur
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen
Art. Nr.	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahren Symbole

Radioaktiv

1. Einleitung und Prinzip des Tests

Der ACHRAB® Ganglionic Assay RIA dient der quantitativen Bestimmung von ganglionäre Acetylcholinrezeptor (gAChR)-Autoantikörpern in humanem Serum. Der Assay ist nur für den Gebrauch durch professionelles Personal und nur für Forschungszwecke bestimmt. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.

Serum-Autoantikörper, die mit gAChR reaktiv sind, werden mit einer gestörten synaptischen Übertragung an autonomen Ganglien in Verbindung gebracht, insbesondere im Zusammenhang mit Autoimmuner Autonomer Ganglionopathie (AAG) und gastrointestinaler Motilität. Funktionelle gAChRs sind pentamer, bestehen aus α3- und β4-Untereinheiten und werden überwiegend in autonomen Ganglien exprimiert. gAChR-Abs binden primär an die α3-Untereinheit. Das Kit ist einfach zu verwenden und bietet einen spezifischen und sensitiven Assay für gAChR-Ak.

Der Assay hängt von der Verwendung von rekombinantem gAChR ab, das mit ^{125}I-markiertem Epibatidin komplexiert ist. Die ^{125}I-markierten gAChRs werden mit Testseren inkubiert und die resultierenden Komplexe mit Anti-Human-IgG immunpräzipitiert. Je höher die Konzentration des Autoantikörpers, desto größer die ausgefällte Radioaktivität.

2. Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Kit ist nur zur In-vitro-Verwendung durch professionelles Personal bestimmt. Befolgen Sie die Anweisungen sorgfältig. Ausführlichere Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt. Das Kit enthält radioaktives Material. Benutzer sollten sich über alle nationalen und lokalen Gesetze und Verhaltenskodizes bezüglich Verwendung, Lagerung, Transport und Entsorgung radioaktiver Stoffe informieren und diese einhalten. Es darf auf keinen Fall an Menschen oder Tiere verabreicht werden. Vermeiden Sie alle Handlungen, die wahrscheinlich zu einer Einnahme führen; Nicht essen, trinken oder rauchen, wo mit radioaktiven Stoffen umgegangen wird. Nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit Haut und Kleidung vermeiden. Schutzkleidung, Einmalhandschuhe und gegebenenfalls Personendosimeter tragen. Radioaktive Materialien dürfen nur von autorisiertem Personal und in ausgewiesenen Bereichen verwendet werden. Nach der Handhabung Hände gründlich waschen. Überwachen Sie Hände und Kleidung, bevor Sie den gekennzeichneten Bereich

verlassen. Materialien menschlichen Ursprungs, die bei der Herstellung des Kits verwendet wurden, wurden getestet und für nicht reaktiv auf HIV1 und 2 sowie HCV-Antikörper und HBsAg befunden, sollten jedoch 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 der Testproben, vor der Entsorgung. Materialien tierischen Ursprungs, die zur Herstellung des Kits verwendet wurden, stammen von als gesund zertifizierten Tieren, diese Materialien sollten jedoch als potenziell infektiös behandelt werden. Einige Komponenten enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie bei allen Komponenten des Kits die Einnahme, Inhalation, Injektion oder den Kontakt mit Haut, Augen oder Kleidung. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie alle Komponenten des Kits mit reichlich Wasser wegspülen.

3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Lagern Sie das Kit nach Ankunft bei 2 – 8 °C. Nach dem Öffnen ist das Kit bis zum Verfallsdatum stabil. Informationen zur Stabilität der vorbereiteten Reagenzien finden Sie unter Vorbereitung der Reagenzien. Verwenden Sie die Komponenten nicht nach Ablauf des auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatums. Mischen Sie nicht verschiedene Chargen einer Kit-Komponente innerhalb eines einzelnen Assays.

4. Inhalt des Kits

4.1. **^{125}I-markierte gAChR** **^{125}I labelled gAChR** 2 Flaschen

lyophilisiert, Aktivität < 6 kBq/Flasche bei Herstellung

4.2. **Negativ Kontrolle** **Control -** 1 Flasche

0,1 ml, gebrauchsfertig

4.3. **Positiv Kontrollen 1 & 2** **Control + I** **Control + II** 2 Flaschen

Je 0,1 ml, gebrauchsfertig,

Für Konzentrationsbereiche siehe QC-Zertifikat

4.4. **Anti-human IgG** **Anti Human IgG** 1 Flasche

2 ml, gebrauchsfertig

4.5. **Rekonstitutions Puffer** **Reconstitution Buffer** 1 Flasche

2 ml, gebrauchsfertig

Zur Rekonstitution des ^{125}I-markierten gAChR

4.6. **Waschlösung** **Wash Solution** 1 Flasche

60 ml, gebrauchsfertig,

Bei 2-8°C lagern, außer wenn in Gebrauch

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Variabel einstellbare Pipetten zum Pipettieren von 10 µl, 50 µl, 0,75 ml und 1 ml
- 4.5 ml Spitzboden-Röhrchen und passendes Gestell
- Zentrifuge mit Kühlung (2-8 °C) und 1500 x g
- Gerät zum Absaugen des Überstands
- Vortex-Mischer
- Gammazähler

5. Probengewinnung und Aufbewahrung

Die Seren können bis zur Verwendung bis zu einer Woche bei 2 – 8 °C im Kühlschrank gelagert werden. Für eine längeren Zeitraum sollten sie bei -20 °C, vorzugsweise aliquotiert, gelagert werden. 20 µL reichen für einen Assay (Doppelbestimmung mit je 10 µl). Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren sowie eine Erhöhung der Lagertemperatur. Verwenden Sie keine lipämischen oder hämolytischen Serumproben.

6. Vorbereitung der Proben und Reagenzien

6.1 Proben

Bei Bedarf, die Seren bei Raumtemperatur auftauen lassen und vorsichtig durchmischen.

Zentrifugieren Sie die Seren vor dem Assay (vorzugsweise 5 Minuten bei etwa 10.000 x g in einer Mikrozentrifuge), um eventuell vorhandene Partikel zu entfernen. Bitte lassen Sie diesen Zentrifugationsschritt nicht aus, wenn die Seren trüb sind oder Partikel enthalten.

6.2 Auflösen des Tracers

Etwa 10 min vor Gebrauch die lyophilisierten Tracer ^{125}I labelled gAChR mit jeweils 0,75 ml Reconstitution Buffer auflösen. Durch kurzes Vortexen (ca. 5 Sek.) auf einem Vortex-Mischer auflösen und dann das Fläschchen aufrecht halten.

Der rekonstituierte Tracer ist nur wenige Stunden stabil und sollte sofort verwendet werden.

7. Testdurchführung

Lassen Sie alle Reagenzien mit Ausnahme der Wash Solution vor Gebrauch mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) stehen.

7.1. Je 10 µl Control -, Control + I & Control + II und der Seren (jeweils in Doppelbestimmung) in beschriftete Teströhrchen (Spitzboden-Röhrchen empfohlen) pipettieren.

7.2. 50 µl frisch rekonstituiertes ^{125}I labelled gAChR in jedes Röhrchen pipettieren.

7.3. Die Röhrchen vorsichtig auf einem Vortex-Mischer mischen und anschließend verschließen. Bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) für 2 Stunden inkubieren.

Zu Beginn der Inkubationszeit die Totalaktivität in mind. 2 Röhrchen für 2 Minuten in einem Gammazähler bestimmen.

7.4. 50 µl Anti Human IgG in jedes Röhrchen pipettieren.

7.5. Die Röhrchen vorsichtig auf einem Vortex-Mischer mischen und anschließend verschließen. Bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) für 2 Stunden inkubieren.

7.6. 1 ml kalte (2 – 8 °C) Wash Solution in jedes Röhrchen pipettieren und vorsichtig auf einem Vortex-Mischer mischen.

7.7. Die Röhrchen anschließend 20 Minuten bei 1.500 x g und 2 – 8 °C zentrifugieren.

7.8. Vorsichtig den Überstand aus den Röhrchen absaugen oder dekantieren.

7.9. 1 ml kalte (2 – 8 °C) Wash Solution in jedes Röhrchen pipettieren und das Pellet vorsichtig mit einem Vortex-Mischer resuspendieren.

7.10. Die Röhrchen anschließend 20 Minuten bei 1.500 x g und 2 – 8 °C zentrifugieren.

7.11. Vorsichtig den Überstand aus den Röhrchen absaugen oder dekantieren.

7.12. Die Röhrchen 2 Minuten lang im Gammazähler messen (cpm bestimmen).

8. Testauswertung

Die Radioaktivität im Pellet repräsentiert die Menge an ^{125}I-markiertem gAChR, das von dem gAChR Antiköper gebunden wird. Dies wird oft als Picomol des markierten gebundenen Toxins pro Liter Testserum ausgedrückt und die Beziehung zwischen diesem Parameter und der Pelletradioaktivität kann aus den folgenden Angaben berechnet werden:

- Die im Gammazähler gemessene radioaktiven Zerfälle pro Minute in cpm
- Die spezifische Aktivität A [Ci/mmol] des ^{125}I-markierten Toxins zum Zeitpunkt der Markierung der gAChRs.
- Zerfall Faktor D für den Zerfall von ^{125}I zwischen dem Tag der Herstellung des Tracers und dem Tag der Assaydurchführung.
- Das im Assay verwendete Probenvolumen C (d.h. 10 µl).
- Zähleffizienz B des verwendeten Gammazählers (z.B. 70 %, dann B = 0.7)
- Umrechnungskonstante von Curie in Zerfällen pro Minute (2,22 x 10^{12} dpm/Ci bzw. cpm/Ci)

Werte für A und D entnehmen Sie bitte dem im Kit enthaltenen QC-Zertifikat.

Die anzuwendende (vereinfachte) Formel (1) ist wie folgt:

$$\text{pmol/l} = \frac{(\text{cpm}_{\text{Pos. Kontr. ODER Probe}} - \text{cpm}_{\text{Neg. Kontr.}}) \times 1000 \times D}{C \times A \times B \times 2{,}22\ \text{dpm/Ci}}$$

Rechenbeispiel:

$$\frac{(5.750\ \text{cpm} - 809\ \text{cpm}) \times 1000 \times 1{,}32}{10\ \mu\text{l} \times 1420\ \text{Ci/mmol} \times 0{,}7 \times 2{,}22\ \text{dpm/Ci}} = 295{,}56\ \text{pmol/l}$$

Typische Ergebnisse (Beispiel, nicht als Berechnungsgrundlage verwenden!):

	cpm	**pmol/l**
Negativ Kontrolle	608	**0.0**
Positiv Kontrolle 1	4844	**134,2**
Positiv Kontrolle 2	1505	**28,4**

Es kann mit folgender Formel (2) eine Konstante K berechnet werden, die chargenspezifisch ist und auf dem QC-Zertifikat zu finden ist.

$$K = \frac{1000}{C \times A \times B \times 2{,}22\ \text{dpm/Ci}}$$

Sollte der von Ihnen verwendete Gammazähler nicht eine Zählausbeute B wie auf dem QC-Zertifikat angegeben, haben, dann müssen Sie K entsprechend neu berechnen.

Mit der Konstante K können Sie die Formel (1) auf folgende Formel (3) vereinfachen:

$$\text{pmol/l} = (\text{cpm}_{\text{Pos. Kontr. ODER Probe}} - \text{cpm}_{\text{Neg. Kontr.}}) \times D \times K$$

Damit der Assay gültig ist, müssen die im Assay erzielten Werte der beiden Positivkontrollen im dem auf dem QC-Zertifikat angegebenen Zielbereich liegen.

9. Assay Eigenschaften

Dieses Kit ist nur für Forschungszwecke bestimmt, die folgenden Werte sind nicht für diagnostische Verfahren bestimmt.

Der folgende Assay-Cut-off wurde bestimmt:

Negativ	< 10 pmol/l
Graubereich	zwischen 10 und 15 pmol/l
Positiv	≥ 15 pmol/l

Jedes Labor sollte jedoch seine eigenen normalen und pathologischen Referenzbereiche für gAChR-Ak-Spiegel festlegen. Außerdem wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigene Kontrollprobengruppe in den Assay einbezieht.

Seren von 50 einzelnen gesunden Blutspendern wurden im ACHRAB® Ganglionic Assay RIA getestet. 50 (100 %) wurden als negativ für gAChR-Ak identifiziert.

Seren von 30 Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen als denen mit Verdacht auf AAG und verwandten neurologischen Erkrankungen wurden im ACHRAB® Ganglionic Assay RIA getestet. 29 (96,7 %) der GAD- oder TSH-Rezeptor-Autonantikörper-positiven Proben wurden in dieser Studie negativ auf gAChR-Ak getestet, wobei 1 weitere Probe (3,3 %) im Graubereich lag.

10. Vorgenommene Änderungen

Version _2: Assay wird im Originalkitkarton bereitgestellt. Entsprechend wurden die Herstellerangaben und Komponentennamen in der Gebrauchsanweisung aktualisiert.

Version _1: Erstellung der Gebrauchsanweisung. Keine Änderungen zu deklarieren.

11. Literatur

- Vernino et al.
  Autoantibodies in ganglionic acetylcholine receptors in autoimmune autonomic neuropathies.
  N. Engl. J. Med. 2003; **343**: 847-855

- McKeon et al.
  The ganglionic acetylcholine receptor autoantibody: oncological, neurological and serological accompaniments
  Arch. Neurol. 2009 **66**: 735-741

Pipettierschema

Lassen Sie alle Reagenzien außer der Waschlösung vor Gebrauch mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) stehen

		Negativ Kontrolle	Positiv Kontrollen	Proben
Control -	µl	10		
Control + I & + II	µl		10	
Proben	µl			10

^{125}I labelled gAChR	µl	50	50	50

Vorsichtig mischen (Vortex)
Totalaktivität (cpm) in 2 Röhrchen für 2 Minuten im Gammazähler bestimmen
Röhrchen verschließen
2 Stunden bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubieren

Anti Human IgG	µl	50	50	50

Vorsichtig mischen (Vortex)
Röhrchen verschließen
2 Stunden bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubieren

Wash Solution (kalt)	ml	1	1	1

20 Minuten bei 1500 x g und 2-8 °C zentrifugieren
Überstand vorsichtig absaugen oder dekantieren

Wash Solution (kalt)	ml	1	1	1

Pellet durch vorsichtiges Mischen resuspendieren (Vortex)
20 Minuten bei 1500 x g und 2-8 °C zentrifugieren
Überstand vorsichtig absaugen oder dekantieren
Röhrchen 2 Minuten im Gammazähler messen (cpm)