







Gebrauchsanweisung

Canine ACHRAB RIA

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

Nur für veterinärmedizinische Diagnostik









	RA119/25
	25
	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

Inhaltsverzeichnis

1	Klinische Bedeutung und Testprinzip.....	3
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	4
3	Lagerung und Stabilität der Reagenzien	4
4	Inhalt des Testbestecks	5
5	Probengewinnung und Aufbewahrung.....	6
6	Assayvorbereitung	6
7	Testdurchführung.....	7
8	Testauswertung	8
9	Assay Eigenschaften.....	9
10	Literatur	11
11	Änderungen	11
	Pipettierschema	12

Verwendete Symbole

	Inhalt		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen
	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



Dieses Kit ist lediglich für die veterinärmedizinische Diagnostik bestimmt. Dieses Kit ist nur für den In-vitro-Gebrauch durch Fachpersonal bestimmt. Befolgen Sie die Anweisungen sorgfältig. Beachten Sie die auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten und die angegebene Haltbarkeit der rekonstituierten Reagenzien. Ausführlichere Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt. Das Kit enthält radioaktives Material. Die Benutzer sollten sich über alle nationalen und lokalen Gesetze und Verhaltensregeln für die Verwendung, Lagerung, den Transport und die Entsorgung von radioaktivem Material informieren und diese einhalten. Vermeiden Sie alle Handlungen, die zum Verschlucken führen können. Vermeiden Sie den Kontakt mit Haut und Kleidung. Schutzkleidung und ggf. Personendosimeter tragen. Radioaktive Stoffe sollten nur von befugtem Personal und in ausgewiesenen Bereichen verwendet werden. Das bei der Herstellung des Kits verwendete Material menschlichen Ursprungs wurde auf HIV1 und 2 sowie HCV-Antikörper und HBsAg getestet und als nicht reaktiv befunden, sollte aber dennoch als potenziell infektiös behandelt werden. Waschen Sie sich nach der Handhabung gründlich die Hände. Kontrollieren Sie Hände und Kleidung, bevor Sie den vorgesehenen Bereich verlassen. Waschen Sie sich gründlich die Hände, wenn eine Kontamination stattgefunden hat und bevor Sie das Labor verlassen. Alle potenziell kontaminierten Abfälle, einschließlich der Testproben, sind vor der Entsorgung zu sterilisieren. Die bei der Herstellung des Kits verwendeten Materialien tierischen Ursprungs wurden von Tieren gewonnen, die als gesund zertifiziert sind, sollten jedoch als potenziell infektiös behandelt werden. Einige Komponenten enthalten geringe Mengen an Natriumazid als Konservierungsmittel. Bei allen Bestandteilen des Kits sind Verschlucken, Einatmen, Injektion oder Kontakt mit Haut, Augen oder Kleidung zu vermeiden. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abwassersystem, indem Sie alle Bestandteile des Kits mit reichlich Wasser wegspülen.

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 Kits

¹²⁵I-Labelled Canine AChR		2 Flaschen
Aktivität ~ 20 kBq je Flasche Lyophilisat		
¹²⁵ I-alpha-Bungarotoxin markierter hunde-spezifischer Acetylcholinrezeptor		radioaktiv
Nach dem Auflösen, sofort verwenden		
Negative Control	CONTROL -	1 Flasche
0,1 ml, gebrauchsfertig		
Positive Control	CONTROL +	1 Flasche
0,1 ml, gebrauchsfertig		
Anti-IgG-Ab		1 Flasche
1,5 ml, gebrauchsfertig		
Wash Solution		1 Flasche
60 ml, gebrauchsfertig, bei 2-8°C lagern und kalt verwenden		
Precipitation Enhancer		1 Flasche
1 ml, gebrauchsfertig, vor Gebrauch gut durchmischen		Gefahr
Reconstitution Buffer for ¹²⁵I Labelled Canine AChR		1 Flasche
4 ml, gebrauchsfertig, zum Rekonstituieren des ¹²⁵ I-Labelled Canine AChR Lyophilisats		
Normal 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 Proben

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 Serum erstmals getestet, sollten 5 µl des Serums unverdünnt eingesetzt werden.

6.2 Verdünnung der Seren

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

6.3 Auflösen des ¹²⁵I-Labelled Canine AChR

Kurz vor Gebrauch wird der ¹²⁵I-Labelled Canine AChR je Fläschchen mit 0,75ml Reconstitution Buffer for ¹²⁵I-Labelled Canine AChR aufgelöst. Das Fläschchen wird anschließend leicht geschwenkt, bis sich eine homogene, leicht trübe Lösung gebildet hat. Ein (zwei) Fläschchen reicht für die Messung der Positive Control, Negative Control und 5 (12) Proben jeweils in Doppelbestimmung. Bei Verwendung von 2 Fläschchen diese poolen. Der angesetzte ¹²⁵I-Labelled Canine AChR muss zeitnah verwendet werden und ist nicht haltbar.

7 Testdurchführung

Alle Kitkomponenten, außer der Wash Solution, für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur bringen.

1. Pro beschriftetes Polystyrol-Röhrchen, 5 µl Positive Control **CONTROL +**, 5 µl Negative Control **CONTROL -** und 5 µl Serumprobe (jeweils in Doppelbestimmung) pipettieren. Die Kontrollen bei jedem Testlauf mitführen.
2. Pro Röhrchen 50 µl frisch angesetzten ¹²⁵I-Labelled Canine AChR (s. 6.3) 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 Ab pipettieren. Vorsichtig auf einem Vortexer mischen. Die Röhrchen mit einem geeigneten Deckel verschließen. Für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Pro Röhrchen 25 µl Precipitation Enhancer pipettieren.
5. Pro Röhrchen 1 ml kalte (2-8°C) Wash Solution 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) Wash Solution 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 Serum 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:

$$(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Negative-Control}}) \times D$$

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

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	=	Zählausbeute 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:

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

Sollte die Zählausbeute Z 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 beigelegten 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. Ctrl.	Konzentration ACHRAB in nmol/l
Negative Control	454	0	0
Serum 1 (unverdünnt)	3.291	2.837	1,1

Typische Werte (Beispiel, nicht als Berechnungsgrundlage verwenden)

	cpm	Konzentration ACHRAB in nmol/l
Negative Control	1004	0,0
Positive Control	7.688	4,1

9 Assay Eigenschaften

9.1 Cut Off

Negativ	< 1,0 nmol/l
Positiv	≥ 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 mit verschiedenen Serumproben ein eigenes Referenz-Panel erstellt.

Eine publizierte Studie zeigte: "Bei einem Cut-off von 1,3 nmol/l zeigte der Canine ACHRAB RIA eine Sensitivität von 100 %, eine Spezifität von 98,20 %, einen PPV von 80,00 % und einen NPV von 100 %. Wenn nur Hunde mit neuromuskulären Krankheiten und Megaösophagus betrachtet wurden, ergaben sich folgende Ergebnisse: Sensitivität 100 %, Spezifität 97,50 %, PPV 94,12 %, NPV 100 %. Beim Vergleich mit der Referenzmethode zeigte der neue

RIA meist höhere Messwerte und erschien bei einzelnen Patienten sensitiver." Orig. Zitat von: Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2023; 51: 55–62, DOI 10.1055/s-0043-1760812

9.2 Linearitätsbereich

Jedes positive Serum 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 Serum zu Serum unterschiedlich. Dieser Bereich muss deshalb für jedes positive Serum durch verschiedene Verdünnungen mit Normal Serum ausgetestet werden. Ein Abschätzen der geeigneten Verdünnung ist in der Verlaufskontrolle durch Kenntnisse der Vorwerte möglich.

Der Verdünnungsfaktor muss entsprechend im Endergebnis einberechnet werden.

9.3 Klinische Spezifität

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

9.4 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

- H. Bauer, G. Buhmann, J. van Renen, T. Steinberg, K. Putschbach, A. Fischer
Klinische Validierung eines neuen Radioimmunoassays für die Diagnose von Myasthenia gravis bei Hunden
Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2023; 51: 55–62
- 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

Version _6: Die Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen, sowie Bezeichnungen der Komponenten laut Originalhersteller wurden übernommen.

Version _5: Die Ergänzung in Abschnitt 9 ist grau hervorgehoben. Das Pipettierschema wurde korrigiert, um die Abfolge in Abschnitt 7 zu entsprechen.

Pipettierschema

Komponenten (außer Wash Solution) und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung messen.

		Negative Control	Positive Control	Probe
CONTROL -	μl	5		
CONTROL +	μl		5	
Serum	μl			5
¹²⁵ I-Labelled Canine AChR (frisch)	μl	50	50	50

Vorsichtig mischen (Vortex)

Mit drei Röhrchen Totalaktivität im Gamma-Counter bestimmen und dokumentieren.

Verschlossen 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.

Anti-IgG Ab	μl	50	50	50
-------------	----	----	----	----

Vorsichtig mischen (Vortex)

Verschlossen 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.

Precipitation Enhancer	μl	25	25	25
Wash Solution (kalt)	ml	1	1	1

Vorsichtig mischen (Vortex)

20 Minuten bei 1.500 x g und 2-8°C zentrifugieren.

Überstand absaugen oder vorsichtig dekantieren.

Wash Solution (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.

Röhrchen 2 Minuten im Gamma-Counter messen.