



Arbeitsanleitung

ACHRAB[®] Assay RIA

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



REF	RA001/25	RA105/100
	25	100
	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	3
2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	3
3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien	Seite	4
4. Inhalt des Testbestecks	Seite	5
5. Probengewinnung und Aufbewahrung	Seite	6
6. Probenvorbereitung	Seite	7
7. Testdurchführung	Seite	8
8. Testauswertung	Seite	9
9. Normalbereich	Seite	11
10. Spezifität und Sensitivität	Seite	11
Histogramm verschiedener Patientengruppen	Seite	12
11. Linearitätsbereich	Seite	13
12. Reproduzierbarkeit	Seite	13
13. Verdünnungskurven	Seite	14
14. Literatur	Seite	15
Pipettierschema	Seite	16

Verwendete Symbole

 IVD	In-Vitro-Diagnostikum		CE markiert
 CONT	Inhalt		Verwendbar bis
 LOT	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
 REF	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole



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 ACHRAB®-Assay verwendet Acetylcholinrezeptoren aus einer humanen Zelllinie als Antigen. Die Rezeptoren sind mit ^{125}I -alpha-Bungarotoxin, einem Schlangengift, das hochspezifisch und fast irreversibel an den Rezeptor bindet, radioaktiv markiert. Bei der Inkubation mit Patientenserum binden sich Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper an den markierten Rezeptor. Der Antikörper-Rezeptor-Komplex wird mit einem anti-human IgG-Antiserum ausgefällt. Die im Präzipitat gemessene Radioaktivität ist ein Maß für die Autoantikörper-Konzentrationen im Serum.

Laut Literatur werden bei 95 - 99 % der Patienten mit generalisierter und bei 55 - 70 % der Patienten mit okulärer Myasthenie Autoantikörper gegen Acetylcholinrezeptoren gefunden. Daher ist der Radiorezeptor-assay ein hochspezifischer und sensitiver Test bei der Diagnose einer Myasthenie. Da die Antikörper-Konzentrationen beim einzelnen Patienten gut mit dem klinischen Zustand korrelieren, eignet sich der Test auch sehr gut zur Verlaufskontrolle einer Myasthenie.

2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch 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 Berühren mit der Haut vermeiden.

- Für den Umgang mit radioaktiven Stoffen gelten die Vorschriften der Strahlenschutzverordnung vom 30. Juni 1989 (zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 18. August 1997; BGBl. I, S. 2113).
- 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 aufwischen, kontaminierte Flächen oder Gegenstände mit geeigneten Detergenzien reinigen.
- Fester und flüssiger Abfall sind gemäß §§ 81 - 86 StrSchV zu behandeln.
- Radioaktive Reagenzien dürfen nur an Personen abgegeben werden, die im Besitz einer gültigen Umgangsgenehmigung sind.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg bzw. gegen 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. Direkte Sonneneinstrahlung ist zu vermeiden.

Das Verfallsdatum sowie die Chargenbezeichnung sind auf jedem Fläschchen bzw. Kit angegeben. Bei größeren Ansätzen möglichst nur Reagenzien einer Charge verwenden.

4. Inhalt des Testbestecks

4.1 ¹²⁵I-Rezeptor

TRACER



1 (4) Fläschchen

Aktivität < 75 kBq je Fläschchen
Lyophilisat,
¹²⁵I-alpha-Bungarotoxin markierter
humaner Acetylcholinrezeptor.

**Nach Auflösen ist der Rezeptor bei 2 - 8 °C mindestens
2 Wochen haltbar.**

4.2 Negative Kontrolle

CONTROL -

1 Fläschchen

0,1 ml, gebrauchsfertig,
enthält normales Humanserum.

4.3 Positive Kontrollen

CONTROL A

&

CONTROL B

2 Fläschchen

je 0,1 ml, gebrauchsfertig,
enthält Humanserum mit Antikörpern
gegen den Acetylcholin-Rezeptor.
Konzentrationsbereiche siehe QC-Zertifikat.

4.4 Anti-human-IgG

ANTI-IGG

1 Fläschchen

1,5 ml (5,5 ml) gebrauchsfertig.

4.5 Waschlösung

WASH BUFFER

1 (2) Flasche(n)

70 ml (120 ml), gebrauchsfertig.
enthält PBS mit 0,01 % Triton X-100.

4.6 Normalserum

SERUM

1 Fläschchen

1 ml (4 ml), gebrauchsfertig,
enthält humanes Normalserum
zum Verdünnen hoher Patientenseren.

4.7 Puffer

BUFFER

1 (4) Fläschchen

4 ml, gebrauchsfertig,
zum Rekonstituieren der Rezeptoren.

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten 5, 50, 100 µl und 1 ml Pipetten
- Einmalspritze mit Nadel für mind. 2,7 ml
- Polystyrol-Rundboden-Röhrchen
- Zentrifuge (möglichst mit Kühlung) mit 3.000 x g
- Dest. Wasser
- Absaugvorrichtung
- Vortex-Mischer
- Gamma-Counter

5. Probengewinnung und Aufbewahrung

Für den Test kann Serum oder Plasma eingesetzt werden. Hämolytische bzw. lipämische Proben sollten nicht verwendet werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben vermeiden. Proben, die eine Trübung zeigen, sollten vor dem Test zentrifugiert werden.

Die Proben können bis zu einer Woche bei 2 - 8 °C im Kühlschrank oder eingefroren bei -20 °C für einen längeren Zeitraum gelagert werden.

6. Probenvorbereitung

6.1 Patientenproben

Vor dem Test sollen die Proben auf Raumtemperatur gebracht und durchmischt werden. Es empfiehlt sich, eingefrorene Proben nach dem Auftauen kurz zu zentrifugieren, um eventuelle Schwebeteilchen zu entfernen.

6.2 Verdünnung der Patientenproben

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

6.3 Auflösen der markierten Rezeptoren TRACER

Ca. 30 Min. vor Gebrauch wird der lyophilisierte Tracer je Fläschchen mit **2,7 ml** Puffer aufgelöst. Das Fläschchen wird anschließend leicht geschwenkt, bis sich eine homogene, leicht trübe Lösung gebildet hat. Der Tracer enthält eine Aktivität von ca. 100.000 cpm pro 100 µl.

7. Testdurchführung

- 7.1 5 µl unverdünnte Kontrollseren und 5 µl unverdünnte oder mit Normalserum verdünnte Patientenseren werden in Polystyrolröhrchen in Doppelbestimmung pipettiert. Die negative und die positiven Kontrollen sollten bei jedem Testlauf mitgemessen werden.
- 7.2 Zu jedem Röhrchen werden 100 µl ^{125}I -Rezeptor pipettiert und anschließend gemischt. Die Röhrchen werden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Messung der Totalaktivität empfiehlt es sich, drei Röhrchen während dieser Inkubation im Gamma-Counter zu messen, um auf diese Art Tracer-Reagenz zu sparen.
- 7.3 Zu jedem Röhrchen werden 50 µl Anti-human-IgG pipettiert und anschließend gemischt. Die Röhrchen werden 30 Minuten bei Raumtemperatur oder 18 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubiert.
- 7.4 Zu jedem Röhrchen wird 1 ml Waschlösung gegeben.
- 7.5 Die Röhrchen werden anschließend 20 Minuten bei 3.000 x g zentrifugiert. Es empfiehlt sich der Gebrauch einer kühlbaren Zentrifuge.
- 7.6 Der Überstand wird aus den Röhrchen abgesaugt oder dekantiert.
- 7.7 Zu jedem Röhrchen wird wiederum 1 ml Waschlösung gegeben. Anschließend wird der Niederschlag mit Hilfe eines Vortex-Mischers (mindestens 10 Sek. lang) aufgeschüttelt.
- 7.8 Die Röhrchen werden anschließend 20 Minuten bei 3.000 x g zentrifugiert.
- 7.9 Der Überstand wird aus den Röhrchen abgesaugt oder dekantiert.
- 7.10 Die Röhrchen werden 1 Minute im Gamma-Counter gemessen.

8. Testauswertung

Die Konzentration der Acetylcholinrezeptor-Antikörper wird, da die genauen stöchiometrischen Verhältnisse im Bungarotoxin-Rezeptor-Antikörper Komplex nicht bekannt sind, als Nanomol Bungarotoxin-Bindungsstellen pro Liter Serum angegeben. Die Konzentration der Antikörper berechnet sich aus der Formel:

$$\frac{(\text{cpm Probe} - \text{cpm Negative Kontrolle}) \times D}{\text{Serumvolumen } (\mu\text{l}) \times \text{spez. Aktivität Bungarotoxin} \times Z \times U}$$

- cpm = gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
D = Faktor für Zerfall nach Markierung
Z = Zählrohr des Gamma-Counters (wird als 0,7 angenommen)
U = Umrechnungskonstante von Zerfällen pro Minute in Curie
($2,22 \times 10^{12}$ dpm/Ci)

Die Meßwerte im Nenner werden als Konstante K zusammengefaßt. K ist so berechnet, daß die Ergebnisse in nmol/l erhalten werden.

K ist chargenspezifisch und auf dem im Kit beigelegten Zertifikat angegeben.

Somit vereinfacht sich die Formel auf:

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

D ist die Radioaktivität zum Zeitpunkt der Markierung geteilt durch die Radioaktivität zum Zeitpunkt der Testdurchführung und wird für jede Woche von der nachfolgenden Tabelle abgelesen. Der Tag der Markierung ist auf dem Zertifikat angegeben.

Woche der Testdurchführung nach Markierung	Faktor D
1. - 2.	1.12
2. - 3.	1.22
3. - 4.	1.32
4. - 5.	1.43
5. - 6.	1.55
6. - 7.	1.68
7. - 8.	1.82
8. - 9.	1.98
9. - 10.	2.14

War der Tag der Markierung z. B. der 01. November, so bedeutet "1. - 2. Woche nach Markierung" der Zeitraum vom 08. bis 15. November mit einem Faktor D von 1,12.

K gilt für eine Zählerausbeute des Gamma-Counters von 70 %; bei anderen Zählerausbeuten (in der Bedienungsanleitung des Gerätes angegeben) muß K entsprechend angepaßt werden.

Berechnungsbeispiel:

Der Faktor K sei $0,33 \times 10^{-3}$, D sei 1.22 (2. - 3. Woche), so daß sich für unverdünnte Seren die Rechenkonstante zu $0,40 \times 10^{-3}$ ergibt.

Probe	Mittelwert cpm	Mittelwert cpm – cpm Neg. Kontr.	Konzentration ACHRAB in nmol/l
Negative Kontrolle	454	0	0
Patientenserum 1 (unverdünnt)	3.291	2.837	1,1
Patientenserum 2 (1 : 21 verdünnt)	2.439	1.985	16,7

9. Normalbereich

Gesunde Blutspender zeigen Werte bis 0,15 nmol/l. Werden für die Ermittlung des Normbereiches auch die Werte von Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen und anderen neuromuskulären Erkrankungen berücksichtigt, ergibt sich eine obere Grenze von 0,25 nmol/l für eine 95%ige Spezifität. Oberhalb von 0,4 nmol/l wurden bisher keine falsch positiven Werte gefunden.

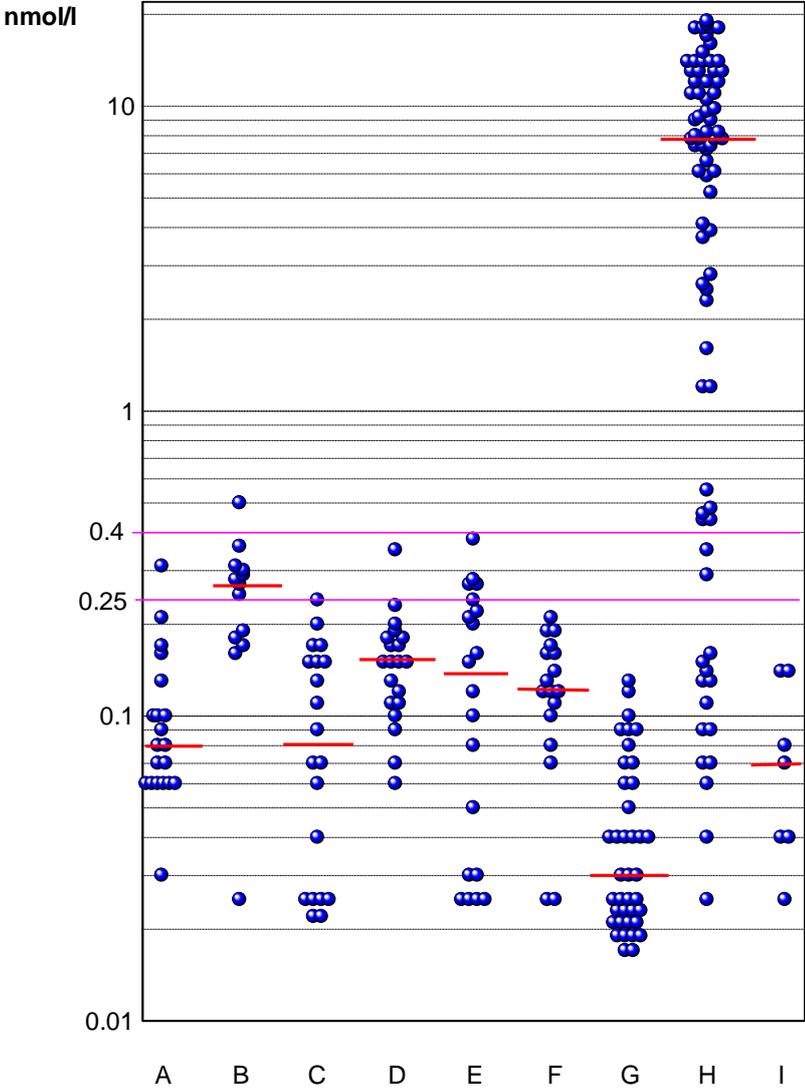
Ein Beispiel für die Verteilung von ACHRAB-Konzentrationen bei unterschiedlichen Krankheitsbildern ist auf der folgenden Seite in einem Histogramm dargestellt.

Es empfiehlt sich daher, den Normbereich mit $< 0,25$ nmol/l mit einer Grauzone bis 0,4 nmol/l anzugeben.

10. Spezifität und Sensitivität

Der ACHRAB[®]-Assay weist spezifisch Autoantikörper gegen den humanen Acetylcholinrezeptor nach. Kreuzreaktionen anderer Autoantikörper konnten nicht beobachtet werden. Detaillierte Ergebnisse sind im nachfolgenden Histogramm dargestellt.

Histogramm verschiedener Patientengruppen



A	Morbus Basedow	n = 13
B	Primäre biliäre Zirrhose	n = 13
C	Hashimoto, Tg-Antikörper pos.	n = 20
D	Hashimoto, TPO-Antikörper pos.	n = 20
E	SLE	n = 20
F	Rheumatoide Arthritis	n = 17
G	Normalpersonen	n = 40
H	Myasthenia gravis (generalisiert und okulär)	n = 76
I	andere neuromuskuläre Erkrankungen	n = 7

11. 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 ausgetestet werden. Ein Abschätzen der geeigneten Verdünnung ist in der Verlaufskontrolle durch Kenntnisse der Vorwerte möglich.

Nach bisherigen Erfahrungen ist der Bereich bis ca. 1,5 nmol/l für alle unverdünnten Seren linear.

Auf der folgenden Seite sind Verdünnungskurven als Beispiel für den Linearitätsbereich in einem Diagramm dargestellt.

Die Seren 1 und 2 zeigen unverdünnt einen Wert von ca. 12 nmol/l; der nach Verdünnung ermittelte richtige Wert liegt bei 66 bzw. 74 nmol/l.
Die Seren 3 und 4 zeigen unverdünnt einen Wert von 8 bzw. 9 nmol/l; der nach Verdünnung ermittelte richtige Wert liegt bei 29 bzw. 25 nmol/l.

12. Reproduzierbarkeit

Die intra- und inter-Assay-Variationskoeffizienten wurden mit 2 Proben unterschiedlicher Konzentration ermittelt.

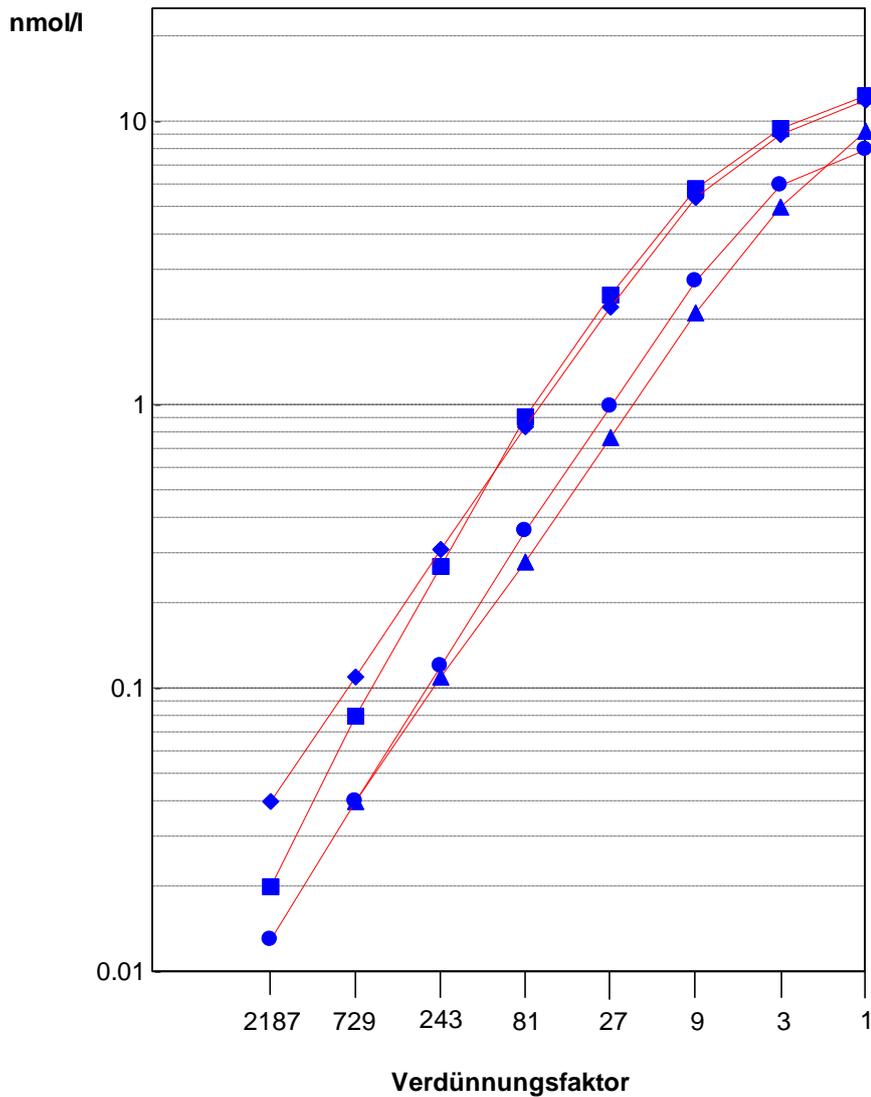
intra-Assay Variation (n=10)		
Probe	MW (nmol/l)	VK (%)
1	1,2	8,0
2	4,1	5,0

inter-Assay-Variation (n=12)		
Probe	MW (nmol/l)	VK (%)
1	1,1	14,0
2	4,2	9,0

13. Verdünnungskurven

Die in der Abbildung gezeigten Patientenseren wurden unverdünnt (Verdünnungsfaktor = 1) und nach Verdünnung mit Normalserum im ACHRAB®-Assay gemessen. Die aus dem linearen Bereich ermittelten Konzentrationen sind:

- Serum 1 : 66 nmol/l
- ◆ Serum 2 : 74 nmol/l
- Serum 3 : 29 nmol/l
- ♦ Serum 4 : 25 nmol/l



14. Literatur

- K.V. Toyka und K. Heininger
Acetylcholin-Rezeptor-Antikörper in der Diagnostik der Myasthenia gravis
Dtsch. med. Wschr. 111 (1986) 1435-1439
- K.V. Toyka, T. Becker, A. Fateh-Moghadam, U.A. Besinger, G. Brehm, D. Neumeier, K. Heininger und K.L. Birnberger
Die Bedeutung der Bestimmung von Antikörpern gegen Acetylcholin-rezeptoren in der Diagnostik der Myasthenia gravis
Klin. Wochenschr. 57 (1979) 937-942
- U.A. Besinger
Myasthenia gravis und myasthenische Syndrome
Lehrbuch der Neurologie, Thieme, Stuttgart (1992) 128-138
Neuroimmunologische Krankheiten
Lehrbuch der Neurologie, Thieme, Stuttgart (1992) 671-675
- Th. N. Witt
Myasthenia gravis - Autoimmunerkrankung mit Modellcharakter
Der Bay. Int. 9 (1989) Nr. 1, 10-21
- K.-W. Pflughaupt, Th. Becker, K.V. Toyka
Azetylcholin-Rezeptor-Antikörper in der Diagnostik der Myasthenia gravis: Stichprobenartige Erhebung zur Zuverlässigkeit des Doppelimmun-Präzipitationstests
Akt. Neurol. 21 (1994) 63-65
- J. Newsom-Davis
Diseases of the Neuromuscular Junction
In: Diseases of the Nervous System
A.K. Asbury, G.M. McKhann, W.I. McDonald, Eds.
W.B. Saunders, Philadelphia (1992) 197-212
- D.B. Drachman
Myasthenia Gravis
N. Engl. J. Med., 330 (1994) 1797-1810
- P.F.Kennel, J.-T.Vilquin, S. Braun, P.Fontenau, J.-M.Warter, P. Poindron
Myasthenia Gravis: Comparative Autoantibody Assays using Human Muscle, TE671 and Glucocorticoid-Treated TE671 Cells as Sources of Antigen
Clin. Immunol. Immunopathol. 74 (1995) 293-296

Pipettierschema

	T	Negative Kontrolle	Positive Kontrollen	Patienten
Neg. Kontrolle μl		5		
Pos. Kontrolle A&B μl			5	
Patientenprobe μl				5
^{125}I -Rezeptor μl	100	100	100	100

Sorgfältig mischen (Vortex) und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren

Anti-human-IgG μl		50	50	50
------------------------------	--	----	----	----

Sorgfältig mischen (Vortex) und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
(alternativ: 18 - 20 Stunden bei 2 - 4 °C inkubieren)

Waschpuffer ml		1	1	1
-----------------------	--	---	---	---

20 Minuten (unter Kühlung) bei mindestens 3.000 x g zentrifugieren
Überstand absaugen oder vorsichtig dekantieren (außer T)

Waschpuffer ml		1	1	1
-----------------------	--	---	---	---

Sorgfältig mischen (Vortex)

20 Minuten (unter Kühlung) bei mindestens 3.000 x g zentrifugieren

Überstand absaugen oder vorsichtig dekantieren (außer T)

Röhrchen 1 Minute im Gamma-Counter messen