




Arbeitsanleitung


ACHRAB[®] Assay RIA

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



REF RA105/100

 100











 ⁺⁸/₋₂ °C 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. Histogramm verschiedener Patientengruppen	Seite	12
11. Linearitätsbereich	Seite	13
12. Verdünnungskurven	Seite	14
13. 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

 radioaktiv

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 ¹²⁵I-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



4 Fläschchen

Aktivität < 75 kBq je Fläschchen
Lyophilisat, wird mit **2,7 ml Puffer** aufgelöst
¹²⁵I-alpha-Bungarotoxin markierter
humaner Acetylcholinrezeptor.

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

4.2 Standards

CAL 1 – **CAL 6**

6 Fläschchen

Je 0,1 ml, gebrauchsfertig,
enthält Humanserum.
Konzentrationen:

Standard	1	2	3	4	5	6
nmol/l	0	0,25	0,5	2	4	8

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

5,5 ml, gebrauchsfertig.

4.5 Waschlösung

WASH BUFFER

2 Flaschen

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

4.6 Normalserum

SERUM

1 Fläschchen

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

4.7 Puffer

BUFFER

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 Patientenseren verdünnt eingesetzt werden. Es empfiehlt sich, feste Verdünnungsstufen einzuhalten. Die Patientenseren 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 Je 5 µl Standards, 5 µl unverdünnte Kontrollseren und 5 µl unverdünnte oder mit Normalserum verdünnte Patientenseren werden in Polystyrolröhrchen in Doppelbestimmung pipettiert.
- 7.2 Je 100 µl ¹²⁵I-Rezeptor in alle Röhrchen (einschließlich Totalaktivität) pipettieren und anschließend mischen. Die Röhrchen werden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
- 7.3 Zu jedem Röhrchen (außer Totalaktivität) 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 (außer Totalaktivität) wird 1 ml Waschlösung gegeben.
- 7.5 Die Röhrchen (außer Totalaktivität) 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 (außer Totalaktivität) 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 wiederum 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 Erstellung der Standardkurve und die Berechnung der Konzentration der Proben erfolgt mit einem IRMA-Programm.

Die gemittelten cpm der Standards (y-Achse, logarithmisch) werden gegen deren jeweilige Konzentration (x-Achse, logarithmisch) in einem Diagramm auftragen. Alternativ können die cpm der einzelnen Standards (B) auf die cpm der Totalaktivität (T) bezogen werden und als % B/T auf der y-Achse gegen Konzentration der Standards auf der x-Achse aufgetragen werden.

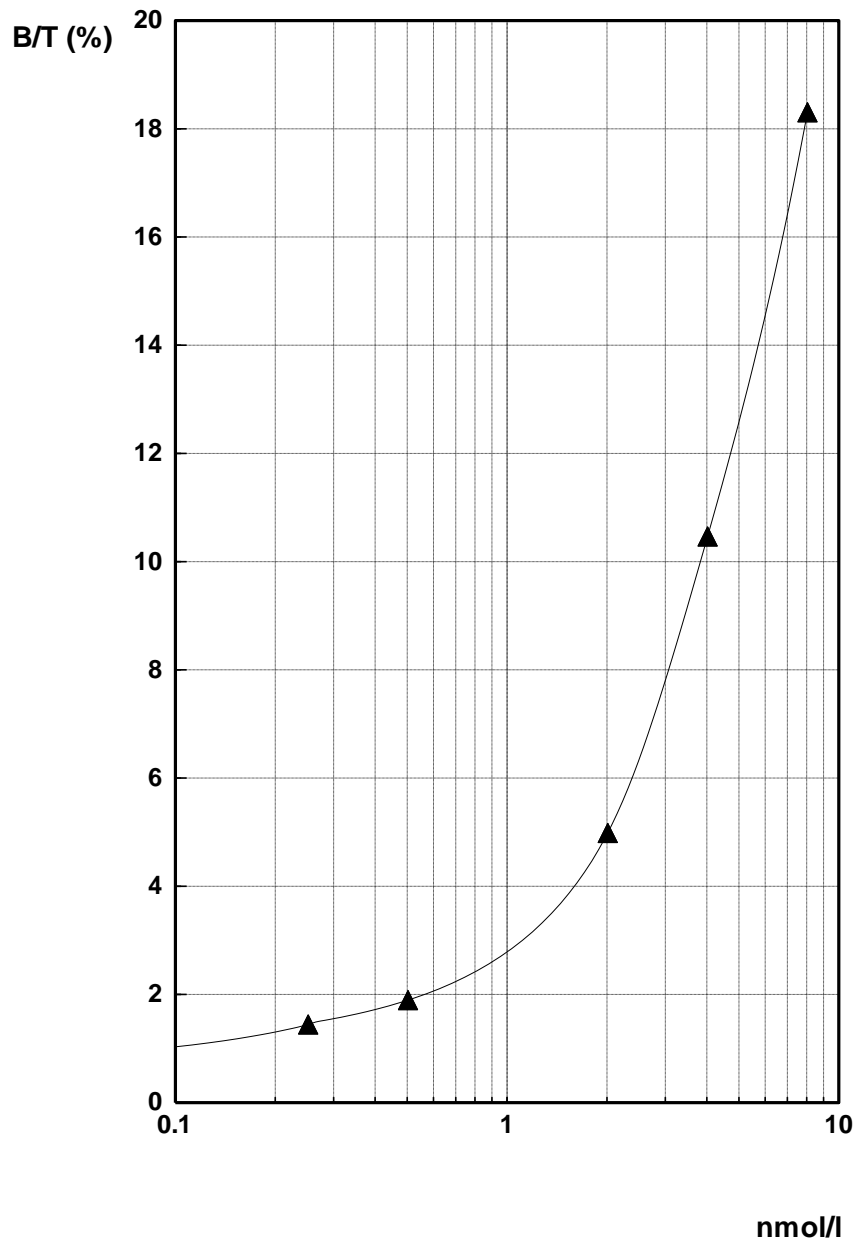
Die Konzentrationen der Proben können dann direkt von der Standardkurve über ihre jeweiligen cpm bzw. % B/T abgelesen werden.

Typisches Beispiel

Nachfolgend ist ein typisches Beispiel einer Standardkurve aufgeführt.

Probe	nmol/l	cpm1	cpm2	Mittelwert	B/T (%)
Totalaktivität		115.934	116.088	116.011	
Standard 1	0	957	901	929	0,8
Standard 2	0,25	1.610	1.786	1.698	1,5
Standard 3	0,5	2.177	2.251	2.214	1,9
Standard 4	2	6.105	5.503	5.804	5,0
Standard 5	4	11.786	12.520	12.153	10,5
Standard 6	8	21.452	21.066	21.259	18,3

Typische Standardkurve



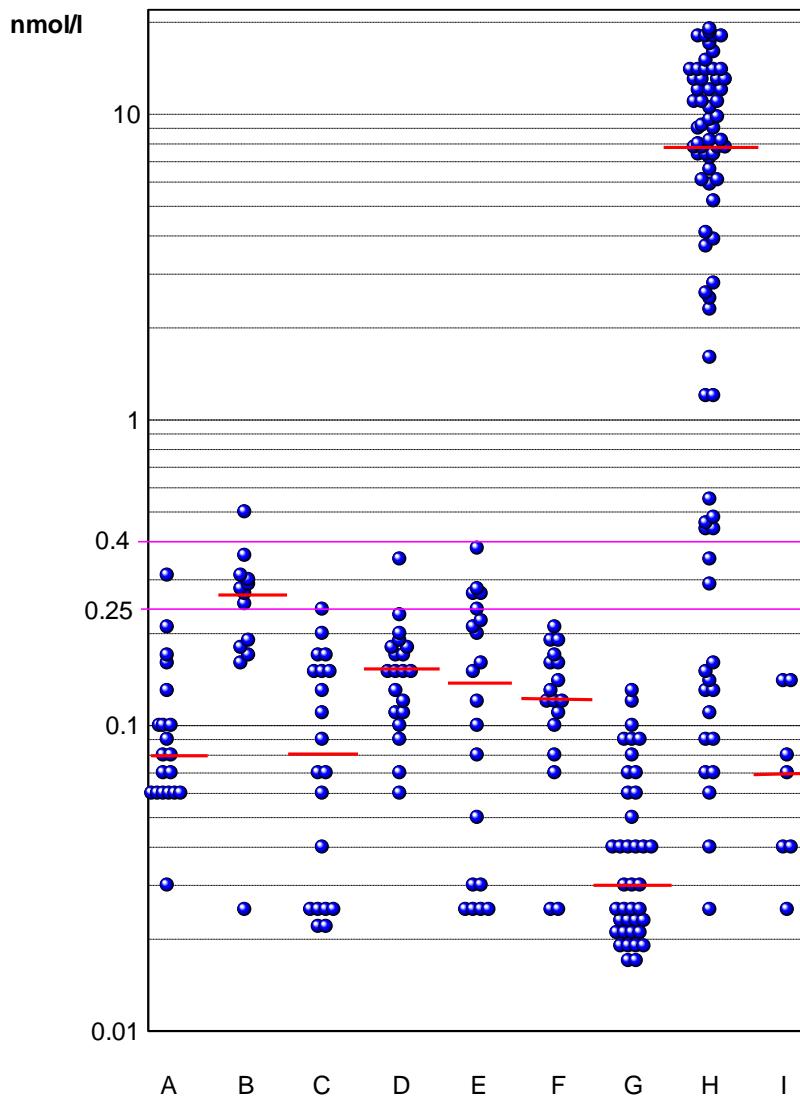
9. Normalbereich

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. 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.

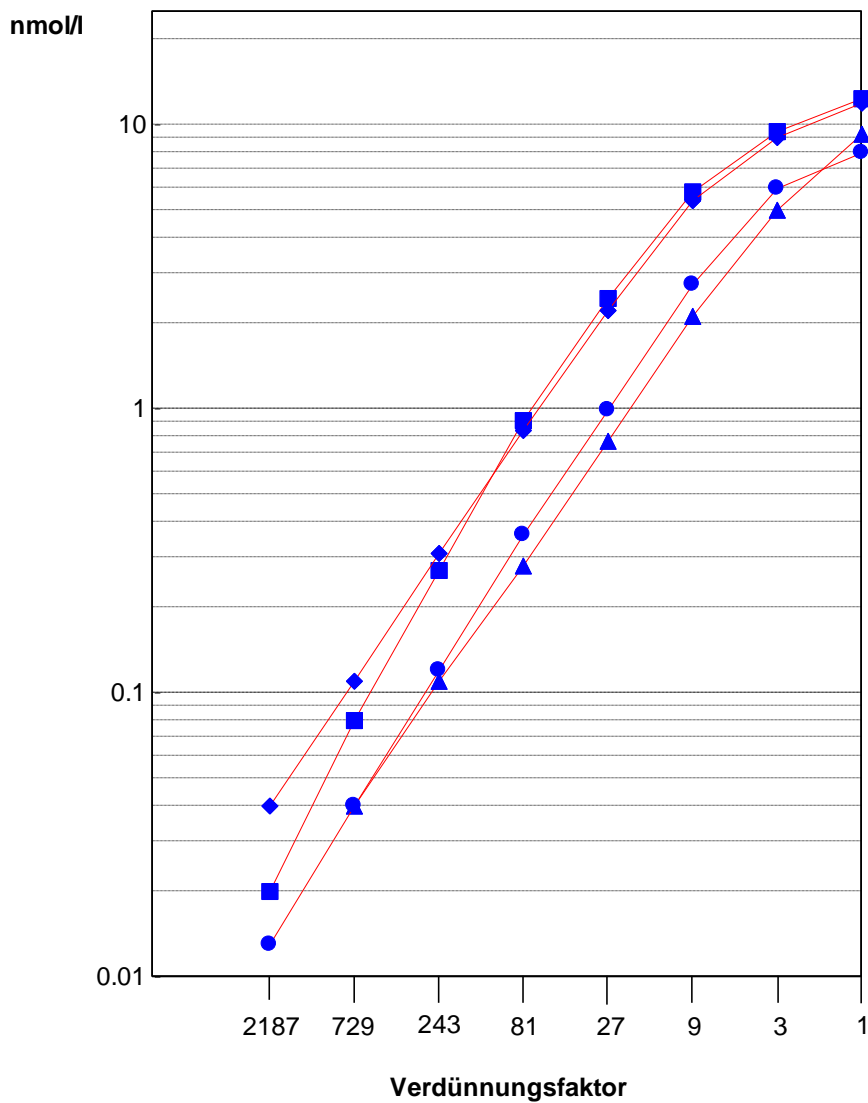
Auf der folgenden Seite sind Verdünnungskurven als Beispiel für den Linearitätsbereich in einem Diagramm dargestellt.

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. Verdünnungskurven

Die in der Abbildung gezeigten Patientenserum 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



13. 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	Standards	Kontrollen	Patienten
Standard 1 - 6 μ l		5		
Kontrolle A & B μ l			5	
Patientenprobe μ l				5

125 I-Rezeptor μ l	100	100	100	100
-----------------------------	-----	-----	-----	-----

Sorgfältig mischen (Vortex) und 2 Stunden bei RT inkubieren

Anti-human-IgG μ l		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