



EIASON[®] AChRAb



Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Acetylcholinrezeptor
Autoantikörper (AChRAb) in menschlichen Serum

Anleitung

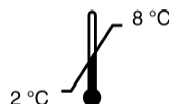
Nur für in-vitro Gebrauch

Produkt von


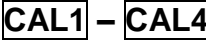




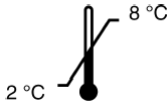



















IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-4
Email: office@iason.eu
www.iason.eu

REF E07-049-96



Verwendete IFU-Symbole

Symbol	Deutsch	Symbol	Deutsch
	In vitro Diagnostikum		Kalibratoren
	Bestellnummer		Positive Kontrollen
	Hergestellt von		Negative Kontrolle
	Lagerung bei		MAb Biotin
	Europäische Konformität		Puffer für 
	Verwendbar bis		Streptavidin Peroxidase
	Chargennummer		Puffer für 
	Foetal Type AChR		Substrat
	Puffer für 		Stopplösung
	Adult Type AChR		Waschlösung
	Mikrotiterplatte		

Verwendungszweck

Nur für in-vitro Gebrauch.

Der EIASON® AChRAb Kit ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörper gegen Acetylcholinrezeptor (AChR) im Humanserum. Diese Antikörper sind verantwortlich für das Fehlverhalten neuromuskulärer Kontakte bei Myasthenia Gravis. Die Bestimmung dieser Antikörper spielt eine bedeutende Rolle in Diagnose und Verlauf der Krankheit.

Messprinzip

EIASON® AChRAb Kit beruht auf der Fähigkeit von AChRAb in Humanserum sich an ähnliche Seiten am Rezeptor zu binden wie verschiedene monoklonale Antikörper wie MAb1 (an Elisa Mikrotiterstreifen gebunden), MAb2 und/oder MAb3 (mit Biotin gelabelt). In der Abwesenheit von AChRAb bildet sich ein Komplex zwischen MAb1, gebunden an die Mikrotiterstreifen, AChR und MAb2 und MAb3 Biotin. MAb2 und MAb3 Biotin werden durch Zugabe von Streptavidin Peroxidase, Substrat und Stopplösung detektiert. In der Anwesenheit von AChRAb wird die Bildung dieses Komplexes verhindert, ersichtlich in einer geringeren Streptavidin Peroxidase Bindung und einer Reduzierung der Absorption bei 450 nm. Je höher die AChRAb Konzentration im Humanserum, desto größer ist die Verhinderung der MAb Biotin Bindung.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON® AChRAb Kit ist nur zur in-vitro Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. IASON kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden (sofern nicht gesetzlich etwas anderes festgelegt ist) haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs. Die Kitreagenzien sind so zu handhaben, als ob eine Übertragung einer Infektionskrankheit möglich sei. Unser Produzent prüft humanes Rohmaterial, dass in diesem Kit zum Einsatz kommt auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper. Da es kein diagnostisches Verfahren gibt, welches derartige Erreger mit 100%iger Sicherheit ausschließt, sind die entsprechenden Komponenten wie potentiell infektiöse Proben handzuhaben. Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis sollten beim Gebrauch und der Entsorgung angewendet werden. Die Entsorgung der Kitreagenzien hat nach den örtlichen Vorschriften zu erfolgen.

Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Dieser Kit ist bei vorschriftsgemäßer Lagerung bis zum Ablauf des Verfallsdatum stabil. Nach Erhalt sind alle Reagenzien bei 2-8°C zu lagern.

Lagerung und Vorbereitung der Patientenproben

Die Proben sollen so rasch wie möglich nach der Abnahme getrennt und analysiert oder bei bzw. unter -20°C gelagert werden. 100 µL ist genug für ein Test (50µL Doppelbestimmung). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Falsche Lagerung der Patientenproben kann zum Verlust der Autoantikörper Aktivität führen.
Keine lipämische und stark hämolytische Patientenproben verwenden.

Studien, in denen EDTA, Citrat und Heparin-Plasmaproben wurden mit AChRAB positive Seren versetzt, zeigten kleine Unterschiede im Messsignal verglichen mit der Referenz-Serumprobe identer Herkunft., . Die Messwerte bei 450nm von den waren im Bereich von 83% - 122% des Messsignals der Referenz Serumprobe (20 Proben mit Serum-Konzentrationen von 0,28 nmol / L - 18 nmol / L)

Wenn erforderlich, die Patientenproben bei Raumtemperatur auftauen lassen und gut vortexen. Serum sollte vor dem Test noch einmal zentrifugiert werden, um eventuell vorhandene Partikel zu entfernen. (5min bei 10 000-15 000 x rpm).

Kitbestandteile

Alle Reagenzien 1 – 14 vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

1. **AChRFOET** Foetal Type AChR; 3 x 0,7 mL; lyophilisiert. Rekonstitution mit 0,7 mL **AChRBU**. Bei Raumtemperatur für 5 min stehen lassen und sofort verwenden um **AChRADULT** zu rekonstituieren.
2. **AChRADULT** Adult Type AChR; 3 x 0,5 mL; lyophilisiert. Rekonstitution mit 0,5 mL **AChRFOET**. Bei Raumtemperatur für 5 min stehen lassen. Nach Rekonstitution innerhalb von 6 Stunden aufbrauchen, wenn bei 2-8°C aufbewahrt.¹
3. **AChRBU** Puffer für AChR; 1 x 5 mL; gebrauchsfertig.
4. **MPL** ELISA Mikrotiterstreifen mit MAb1 beschichtet (96 Wells gesamt, 8 Wells pro Streifen). Vor dem Öffnen der Mikrotiterstreifenpackung sollten diese für mind. 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) lagern. Nicht benötigte Wells in die originale Folienverpackung zurückgeben, zukleben und in das Säckchen mit dem Trockenmittel geben und gut verschließen. Aufbewahren bei 2-8°C.
5. **CAL1** - **CAL4** Kalibratoren; je 0,7 mL; gebrauchsfertig; 0,5; 1,0; 6,5; und 20 nmol/L, toxingebunden
6. **CO1** **CO2** Positivkontrollen; 2 x 0,7 mL; gebrauchsfertig. Konzentration siehe QC-Zertifikat.
7. **NC** Negativkontrolle; 3,0 mL; gebrauchsfertig.
8. **BIO** MAb-Biotin (MAb2 + MAb3); 3 Fläschchen; lyophilisiert; jedes Fläschchen mit der darauf angegebenen Menge **BIOBU** rekonstituieren; für ca. 5 min bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen. Aufbewahrung bei 2-8°C bis zum Kit Verfallsdatum.
9. **BIOBU** Puffer für **BIO**; 15 mL; gebrauchsfertig.
10. **SAPOD** (Streptavidin-Peroxidase; 0,7 mL; 1:20 mit **PODBU** (z.B. 0,5 mL + 9,5 mL) verdünnen. Aufbewahrung bei 2-8°C bis zu 16 Wochen.
11. **PODBU** Diluent für SAPOD; 15 mL; gebrauchsfertig.
12. **SUB** Peroxidase Substrat; Tetramethylbenzidin TMB; 15 mL; gebrauchsfertig.

¹ Die Absorption bei 450 nm wird 10-15% niedriger sein, wenn die rekonstituierten Rezeptoren für 6 Stunden bei 2-8 ° C gelagert wurden.

13. **WASH** Waschlösung; 100 mL; 10 x konzentriert; vor Gebrauch mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen. Nach Verdünnung bei 2-8°C bis zum Kit Verfallsdatum aufbewahren.
14. **STOP** Stopplösung; 10 mL; gebrauchsfertig.

Erforderliches Zubehör

- Pipetten für 25, 50 und 100 µL
- Eppendorf tubes
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenschüttler
- Zentrifuge
- ELISA Photometer (450 nm und 620 nm – optional 405 nm)

Testdurchführung

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Die Anzahl der erforderlichen Streifen für die **MPL** berechnen. Die Streifen fest in den dafür vorgesehenen Rahmen drücken. Die Kitkontrollen sollten in jedem Assay mitgeführt werden. Beachten Sie bitte, dass die optische Dichte von Inkubationszeit und Temperatur abhängig ist. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen und alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Unterbrechungen.

TAG 1

1. 100 µL **NC**, **CAL1** - **CAL4**, **CO1** **CO2** und Patientenproben in 1,5 mL Eppendorf Röhrchen pipettieren.
2. 25 µL des Mixes aus **AChRFOET** und **AChRADULT** (**AChRADULT** + 0,5 mL **AChRFOET**) in die Eppendorf Tubes pipettieren. 10 sec bei 10 – 15.000 rpm zentrifugieren, vortexen und über Nacht bei 2-8°C für 16 – 20 h inkubieren.

TAG 2

1. Eppendorf Tubes nochmals vortexen und 50 µL des Gemisches auf die **MPL** pipettieren. Mikrotiterplatte abdecken und bei Raumtemperatur (20 – 25°C) auf einem Schüttler (500 rpm) für eine Stunde inkubieren.
2. Nach der einstündigen Inkubation die Flüssigkeit absaugen oder dekantieren. 300 µL **WASH** pipettieren. Den Vorgang 2 x wiederholen. Die Waschlösung absaugen oder dekantieren. Die **MPL** auf Zellstoff gut ausklopfen.
3. 50 µL rekonstituiertes **BIO** vorsichtig pipettieren.
4. Platte abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (20-25°C) auf einem Schüttler (500 rpm) inkubieren.

5. Waschschrift siehe Punkt 4. wiederholen.
6. 100 µL **SAPOD** vorsichtig pipettieren.
7. Platte abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) auf einen Schüttler (500 rpm) inkubieren
8. 3 x mit **WASH** wie in Punkt 4 beschrieben waschen. Falls Waschschrift manuell durchgeführt wird noch einmal mit aqua dest. waschen, um eventuell vorhandenen Schaum zu entfernen.
9. 100 µL **SUB** vorsichtig pipettieren.
10. 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) im Dunkeln inkubieren. Während der Inkubation kommt es zu einer Farbentwicklung.
11. Die Farbentwicklung wird durch vorsichtige Zugabe von 50 µL **STOP** unterbrochen (die Zugabe der **STOP** bewirkt einen Farbumschlag von blau auf gelb). Die Platte anschließend ca. 5 Sek. schütteln. Es ist sehr wichtig sicherzustellen, dass die Substratinkubationszeit (d.h. die Zeit von Zugabe des **SUB** bis zur Zugabe der **STOP**) für jedes Well gleich lang ist.
12. Die Absorption der Wells wird bei 450 nm - optional 405 nm - (Referenzfilter 620 – 650 nm) mittels Mikrotiterplattenphotometer innerhalb von 30 Minuten nach dem Hinzufügen der **STOP** gemessen.

oder vollautomatisiert auf:

- **IASON® PersonalLab**
- **IASON® Gladiator**
- **IASON® Quardette**

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen.

Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Ergebnisberechnung

- Eine Standardkurve anlegen, indem man die Werte der Absorption eines jeden Standards gegen die Konzentration aufträgt. So können die Konzentrationen der Patientenproben abgelesen werden.
- Alternative Auswertemethoden können verwendet werden, allerdings sollte bestätigt werden, dass der gewählte Kurvenverlauf geeignet ist und akzeptable Ergebnisse liefert. 4PL (4 Parameter Logistik) oder Point-to-Point – Auswertung werden empfohlen.
- Proben mit hohen AChRAb Konzentrationen können mit EIASON® AChRAb **NC** verdünnt werden, z.B. 10 µL Probe plus 90 µL **NC** um eine 10-fach-Verdünnung zu erreichen. Einige Proben lassen nicht auf eine lineare Weise verdünnen. Wir schlagen vor, dass die Verdünnung, die einen Wert in der Nähe von 50% Inhibition hat, für die Berechnung der AChRAb-Konzentration verwendet wird

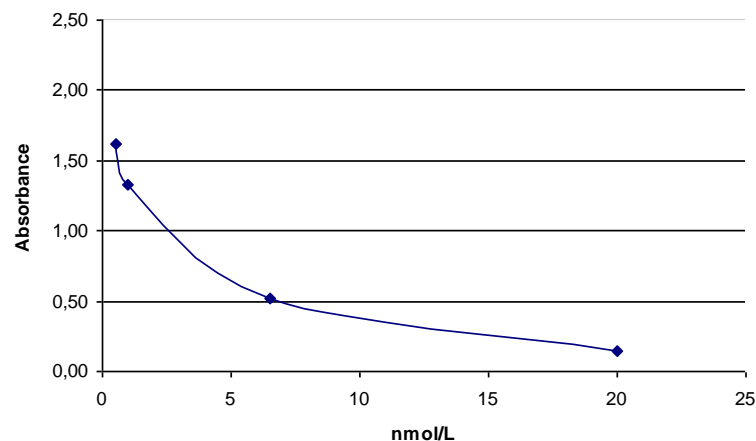
Assay Beispieldaten

Typische Ergebnisse der EIASON® AChRAb Kalibratoren:

Kalibratoren	450 nm	nmol/L
NC	1,970	0.2
CO1	0,469	7.5
CO2	1,124	1.6
CAL1	1,616	0,5
CAL2	1,329	1,0
CAL3	0,524	6,5
CAL4	0,144	20

Diese Daten dienen nur zur Illustration und sollten nicht für die Berechnung der Probenergebnisse verwendet werden.

Typische Eichkurve



Diese Eichkurve dient nur als Beispiel zur Illustration.

Die Ergebnisse können auch als Inhibition (%) von der AChRab Bindung unter der Verwendung folgender Formel ausgedrückt werden;

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{Proben Absorbtion bei 450 nm}}{\text{negativ Controlle (G) Absorbtion bei 450 nm}} \right)$$

Dieser %-Wert der Inhibition kann dann in nmol/L-Toxin umgewandelt werden und in folgender Formel angewendet werden;

$$0,2 \times 2^{(0.067 \times \% \text{ Inhibition der Proben})}$$

Diese Formel wurde empirisch anhand einer Vergleichsmessung unserer IASON ELISA und RIA-Methoden ermittelt. Eine genaue Übereinstimmung der nmol/L-Werte, welche im AChRab ELISA unter Verwendung der Eichkurve und dieser Formel erhalten wurden, kann nicht bei jedem einzelnen Serum erwartet werden.

Probe	Abs. 450nm	% Inhibition	Berechnet nmol/L
NC	1,97	0	0,2
CO1	0,46	76,2	6,9
CO2	1,12	42,9	1,5

Erwartete Werte

	nmol/L
Negativ	< 0,45
Positiv	≥ 0,45

Wir empfehlen jedem Anwender, den Normbereich aus dem aktuellen Patientengut abzuleiten.

Klinische Spezifität:

402 individuelle gesunde Blutspender wurden mit dem EIASON® AChRAb ELISA getestet. 401 Spender (99,8%) wurden negativ auf AChR Autoantikörper getestet. Eine Probe war positiv und ergab einen Wert von 20% Inhibition (0,54 nmol/L aus der Eichkurve, 0,52 nmol/L berechnet).

Klinische Sensitivität:

Proben von 83 mit Myasthenia Gravis diagnostizierten Patienten wurden mit dem EIASON® AChRAb ELISA untersucht. 76 (92%) wurden positiv auf AChR Autoantikörper getestet.

Untere Nachweisgrenze

Die negativen Kontrollen wurden 20-mal getestet und der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden berechnet. Die untere Nachweisgrenze bei 2 Standardabweichungen betrug 0,25 nmol/L.

Präzision

Inter-Assay-Präzision (n = 20)					Intra assay Präzision (n = 24)				
Probe	% Inhibition	VK (%)	nmol/L	VK(%)	Probe	% Inhibition	VK (%)	nmol/L	VK(%)
1	76,4	3,3	7,7	8,7	1	90,8	0,6	13,5	2,5
2	52,4	6,7	2,0	11,1	2	45,9	2,4	1,7	5,2
3	27,3	9,4	0,62	9,4	3	25,9	7,1	0,67	8,5

Klinische Genauigkeit

Die Analyse der 107 Patientenseren mit anderen als Myasthenia-gravis-Autoimmunerkrankungen zeigte keine Interferenz von Autoantikörpern gegen Thyreoglobulin (n=10), Schilddrüsenperoxidase (n=11), dsDNA (n=9), TSH-Rezeptor (n=40), Glutaminsäure-Decarboxylase (n=10), 21-Hydroxylase (n=10) oder von Rheumafaktoren (n=27). Zwei weitere Proben ergaben Werte von 28% (0,74 nmol/L) und 44% (1,5 nmol/L) Inhibition. Eine Probe war von einem Patienten mit Morbus Basedow (TRAb positiv) die andere von einem Patienten mit systematischem Lupus erythematodes (dsDNA Ab positiv). Diese Proben wurden mit den EIASON® AChRAb Kits untersucht und waren auch hier positiv (jeweils Werte von 1,3 und 1,5 nmol/L). Darüber hinaus wurden zwei Patientenproben mit rheumatoider Arthritis (Rheumafaktor positiv) in unserem EIASON® AChRAb positiv und ergaben Werte von 24% (0,77 nmol/L) und 19% (0,61 nmol/L) Inhibition. Die eine von diesen zwei Proben war auch im EIASON® AChRAb positiv (5,3 nmol/L).

Interferenz

Es konnten keine Interferenzen für nachfolgende aufgelistete Substanzen festgestellt werden:

- Intralipid bis zu 3000 mg/dL
- Bilirubin bis zu 20 mg/dL
- Hämoglobin bis zu 5 mg/dL

Rechtliche Grundlagen

Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in „Zuverlässigkeit der Ergebnisse“ genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt „Therapeutische Konsequenzen“ erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

Literatur

R. Hewer et al. A sensitive non-isotopic assay for acetylcholine receptor autoantibodies. Clinica Chimica Acta 2006 **364**: 159 - 166

Arbeitsschema

Alle Reagenzien zuerst auf Raumtemperatur bringen (20-25°C)

1. Pipettieren	NC CAL1 – CAL4, CO1, CO2, Samples in 1,5 mL Eppendorf Tubes 100 µL
2. Pipettieren	AChRFOET und AChRADULT Mixtur 25µL 10 s zentrifugieren bei 10-15 000 g vortexen Inkubieren über Nacht 16-20 h bei 2-8°C
3. Pipettieren	50 µL des Gemisches auf MPL
4. Inkubieren	1 h bei Raumtemperatur schütteln (20-25°C) (500 rpm)
5. Waschen	Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 300 µL WASH pipettieren Vorgang 2 mal wiederholen auf Zellstoff abtropfen
6. Pipettieren	BIO 50 µL
7. Inkubieren	1 h bei Raumtemperatur schütteln (20-25°C) (500 rpm)
8. Waschen	Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 300 µL WASH pipettieren Vorgang 2 mal wiederholen auf Zellstoff abtropfen
9. Pipettieren	SAPOD 100 µL
10. Inkubieren	30 min bei Raumtemperatur schütteln (20-25°C) (500 rpm)
11. Waschen	Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 300 µL WASH pipettieren Vorgang 2 mal wiederholen. Einmal mit aqua dest. waschen
12. Pipettieren	SUB 100 µL
13. Inkubieren	30 min bei Raumtemperatur (20-25°C)
14. Pipettieren	STOP 50 µL
15. Messen	bei 450 nm / 4Parameter oder Point to Point innerhalb von 30 Minuten

Erwartete Werte

	nmol/L
Negativ	< 0,45
Positiv	≥ 0,45



EIASON® AChRAb



Enzymeimmunoassay for the quantitative determination of acetylcholine receptor autoantibodies (AChRAb) in human serum

Kit instruction

For in-vitro use only

Product of



IASON GmbH

Feldkirchner Straße 4

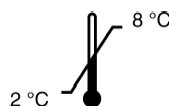
A – 8054 Graz-Seiersberg

Tel.: +43 (0)316 28 43 00



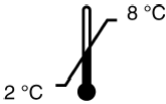



Fax: +43 (0)316 28 43 00-4

Email: office@iason.eu

www.iason.eu



Used IFU-Symbols

Symbol	English	Symbol	English
	In vitro diagnostic device	CAL1 – CAL4	Calibrators
REF	Order number	CO1 CO2	Positive controls
	Product of	NC	Negative control
	Storage	BIO	MAB Biotin
	European Conformity	BIOBU	Buffer for BIO
	Expiry date	SAPOD	Streptavidin peroxidase
	Lot number	PODBU	Buffer for SAPOD
AChRFOET	Foetal type AChR	SUB	Diluent for SAPOD
AChRBU	Buffer for AChRFOET	STOP	Stop Solution
AChRADULT	Adult type AChR	WASH	Concentrated wash solution
MPL	Microplate		

Intended use

For in-vitro use only.

The EIASON® AChRAb kit is an enzymeimmunoassay intended for the quantitative determination of autoantibodies against acetylcholine receptor (AChR) in human serum and plasma, responsible for failure of the neuromuscular junction in myasthenia gravis.

Assay principle

EIASON® AChRAb depends on the ability of AChRAb in human serum to bind to similar sites on the AChR as various monoclonal antibodies such as MAb1 (coated on ELISA plate wells) and/or MAb2 and/or MAb3 (which are labelled with biotin). In the absence of AChRAb a complex is formed between MAb1 coated on the plate wells, the AChR and MAb2 and MAb3 biotin. MAb2 and MAb3 Biotin bound are then detected by addition of streptavidin peroxidase, substrate and stop solution. The higher the concentration of AChRAb in the test serum, the greater the inhibition of MAb-biotin binding.

Warnings and precautions

The EIASON® AChRAb kit is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IASON will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: this kit contains material of human and/or animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Source material from Human origin which is used in this kit was tested and found negative for HbsAG and HIV as well as for HCV antibodies. However, since there is no diagnostic procedure that excludes these agents with 100 percent certainty all components should be handled as potentially hazardous material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Shelf life and storage of reagents

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt, store all reagents at 2-8°C.

Storage and preparation of serum samples

Sera to be analysed should be assayed soon after separation or stored, preferably in aliquots, at or below -20°C. 100µL is sufficient for one assay (duplicate 50µL determinations). Repeated freezing and thawing or increases in storage temperature must be avoided. Incorrect storage of serum samples can lead to loss of autoantibody activity.

Do not use lipaemic or grossly haemolysed serum samples.

Studies in which EDTA, citrate and heparin plasma samples were spiked with AChRAb positive sera showed minor changes in signal compared with spiked serum from the same donor. In particular OD450 values with spiked EDTA, citrate and heparin plasmas were 83% - 122% of spiked serum (20 samples with serum concentrations ranging from 0.28 nmol/L – 18 nmol/L) or 69% - 165% in terms of nmol/L.

When required, bring test sera to room temperature and mix gently to ensure homogeneity. Centrifuge serum prior to assay (preferably for 5 min at 10-15000 rpm in a microfuge) to remove particulate matter. Please do not omit this centrifugation step if sera cloudy or contain particulates.

Materials provided

Allow all reagents 1-14 to reach room temperature before use.

1. **AChRFOET** Foetal Type AChR; 3 vials; lyophilised. Reconstitution with 0.7 mL **AChRBU**. When more than one vial is used, pool the vials and mix gently before use. Pool the vials when more than one vial is required and then use immediately to reconstitute **AChRADULT**.
2. **AChRADULT** Adult Type AChR; 3 x 0.5 mL each; lyophilised. Reconstitution with 0.5 mL **AChRFOET** solution to give a mixture of **AChRFOET** and **AChRADULT**. When more than one vial is used, pool the vials and mix gently before use. Use up to 6 hours after reconstitution if stored at 2-8°C.²
3. **AChRBU** Buffer for **AChRFOET**; 1 x 5 mL; ready for use.
4. **MPL** Microplate coated with MAb1; 12 breakapart strips of 8 wells (96 in total) in a frame and sealed in a foil bag. Allow foil bag to stand at room temperature (20-25°C) for 30 minutes before opening. Ensure wells are firmly fitted in the frame provided. After opening return any unused wells to the original foil bag and seal with adhesive tape. Then place foil bag in the selfseal plastic bag with desiccant provided, and store at 2-8°C for up to kit expiry date.
5. **CAL1** – **CAL4** Calibrators; 0.5; 1.0; 6.5; 20 nmol/L, toxin bound; 0.7 mL each, ready for use.
6. **CO1**, **CO2** Positive Controls; 0.7 mL each; ready for use; see label for concentration range.
7. **NC** Negative Control; 3.0 mL; ready for use.
8. **BIO** MAb Biotin (MAb2 and MAb3); 3 vials; lyophilised; reconstitute each vial with the volume of **BIOBU** shown on the vial label. Mix gently, and leave to stand at room temperature (20–25 °C) for 5 minutes before use. When more than one vial is used, pool the vials and mix gently before use. Store at 2 – 8°C for up to kit expiry date after dilution.
9. **BIOBU** Buffer for **BIO**; 15 mL; ready for use.

² The absorbance at 450 nm will be 10-15% lower when reconstituted receptors have been stored for 6 hours at 2-8C.

10. **SAPOD** Streptavidin Peroxidase, 0.7 mL; concentrated; dilute 1 in 20 with **PODBU**. For example, 0.5 mL **SAPOD**+ 9.5 mL **PODBU**. Store at 2 – 8°C for up to 16 weeks after dilution.
11. **PODBU** Diluent for **SAPOD**; 15 mL; ready for use.
12. **SUB** Peroxidase Substrate TMB; ready for use; 15 mL.
13. **WASH** Concentrated Wash Solution; 100 mL; concentrated; Dilute 1 in 10 with pure water before use. Use up to expiry of kit.
14. **STOP** Stop Solution; 10 mL; ready for use.

Materials required but not provided in the kit

- Pipettes capable of dispensing 25 µL, 50 µL and 100 µL
- Eppendorf tubes
- Distilled water
- ELISA plate reader suitable for 96 well formats and capable of measuring absorbances at 450 and 405 nm
- ELISA plate shaker (capable of 500 shakes/min), not an orbital shaker

Assay procedure

Calculate the number of individual **MPL** wells needed for the assay. Allow all the reagents supplied including the appropriate number of strips to reach room temperature, fit the number of strip wells required firmly into the frame provided. Kit controls should always be included in each assay run.

Please note that the optical density depends on incubation time and temperature. Therefore, it is necessary to bring all reagents to work-ready state before the start of the assay; the caps should be opened and all required wells should be in strip holder. Only such preparation will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.

DAY ONE

1. Pipette 100 µL **NC** **CAL1** - **CAL4**, **CO1**, **CO2** and test sera into 1.5 mL Eppendorf tubes.
2. Pipette 25 µL of **AChRFOET** and **AChRADULT** mixture into each Eppendorf tube and seal the tubes. Centrifuge for 10 s at 10 – 15,000 rpm. Vortex gently and incubate overnight (16 – 20 h) at 2 – 8°C.

DAY TWO

1. Gently mix each tube using a vortex mixer. Pipette 50 µL of each sample-AChR mixture into the ELISA plate wells. Cover the wells and incubate at room temperature (20 – 25°C) on an ELISA plate shaker (500 shakes per min) for one hour.
2. After the 1-hour incubation discard the samples by briskly inverting the frame of strip wells over a suitable receptacle. Wash 3 times with 300 µL

- WASH** per well and each time tap the inverted wells gently on a clean dry absorbent surface to remove any droplets of wash buffer.
3. Pipette carefully 50 µL of reconstituted **BIO** into each well.
 4. Cover the plate and incubate for 1 hour at 20-25°C on an ELISA plate shaker (500 shakes per min).
 5. After the 1 hour incubation with **BIO**, discard the **BIO** by briskly inverting the wells over a suitable receptacle, wash 3 times with **WASH** as described under point 4.
 6. Pipette carefully 100 µL of **SAPOD** into each well.
 7. Cover the plate and incubate for 30 minutes at room temperature (20-25°C) on an ELISA plate shaker (500 shakes per min).
 8. Discard the **SAPOD** by briskly inverting the wells over a suitable receptacle; wash 3 times with **WASH** as described under point 4. For manual washing, wash once more with pure water to remove any foam.
 9. to remove any foam. followed by once with pure water to remove any foam.
 10. Pipette carefully 100 µL of peroxidase **SUB** (TMB) into each well.
 11. Incubate for 30 minutes at room temperature (20-25°C) in the dark during which time a blue colour will develop.
 12. Stop the substrate reaction by careful addition of 50 µL of **STOP** to each well (this will cause the blue colour to turn yellow) and shake the plate for about 5 seconds on a plate shaker to ensure uniformity of the solution in each well. It is most important to ensure that the substrate incubation time (i.e. time from addition of **SUB** to addition of **STOP**) is the same for each well.
 13. Measure the absorbance of each well at 450 nm and 405 nm for overrange filter (reference 620 – 650 nm) within 30 minutes after adding the stop solution.

or fully automated on:

- **IASON® Gladiator**
- **IASON® Quardette**
- **IASON® Personal Lab**

Quality control

The regular use of control samples at several analyte levels is advised to ensure day-to-day validity of results. Controls should be tested as unknowns. Quality Control charts should be maintained to follow the assay performance.

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or IASON GmbH directly.

Calculation of results

- Draw a standard curve by plotting the absorbance of each standard against its concentration. Read off the values of the test samples.
- Alternative data reduction techniques may be employed but users should confirm that the selected curve fit is appropriate and gives acceptable results. 4PL (4 parameter logistics) or point-to-point fits are recommended.
- Samples with high AChRAb concentrations can be diluted in EIASON® AChRAb [NC]. For example 10 µL of sample plus 90 µL of [NC] to give a 10 x dilution. Some sera will not dilute in a linear way and we suggest that the dilution giving a value closest to 50 % inhibition is used for calculation of AChRAb concentration.

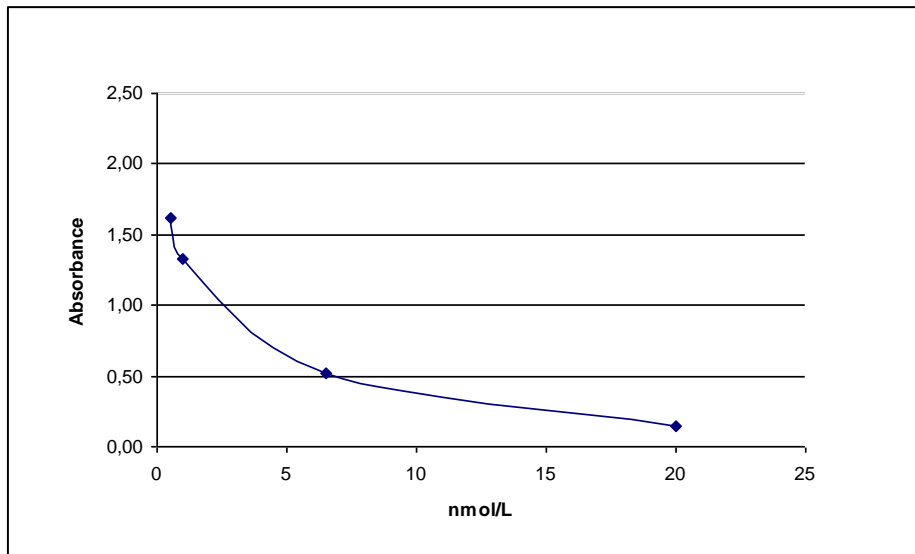
Sample assay data

Typical results obtained with EIASON® AChRAb calibrators:

Calibrators	450 nm	nmol/L
NC	1.970	0.2
CO1	0.469	7.5
CO2	1.124	1.6
CAL1	1.616	0.5
CAL2	1.329	1.0
CAL3	0.524	6.5
CAL4	0.144	20

This data is for illustration only and must not be used for the calculation of any sample result.

Typical calibration curve



This sample calibration curve is for illustration only. Results can also be expressed as inhibition (%) of AChR binding calculated using the formula;

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{test sample absorbance at 450 nm}}{\text{negative control (G) absorbance at 450 nm}} \right)$$

This % inhibition value can then be converted to nmol/L toxin bound using the formula:

$$0.2 \times 2^{(0.067 \times \% \text{ inhibition of test sample})}$$

This formula has been established empirically using a comparison of AChRab measurements by the IASON ELISA and RIA methods. Close agreement between nmol/L values obtained in the AChRab ELISA using the calibration curve and using this formula should not be expected in the case of all individual sera.

Sample	Abs. 450nm	% Inhibition	Calculated nmol/L
NC	1.97	0	0.2
CO1	0.46	76.2	6.9
CO2	1.12	42.9	1.5

Expected Values

	nmol/L
Negative	< 0.45
Positive	≥ 0.45

Each laboratory is recommended to determine ranges for their local population.

Clinical specificity:

402 individual healthy blood donors were assayed in the EIASON® AChRAb ELISA. 401 (99.8 %) were identified as being negative for AChR autoantibodies. One sample was positive and gave a value of 20% inhibition (0.54 nmol/L from the calibration curve, 0.52 nmol/L calculated).

Clinical sensitivity:

Samples from 83 patients diagnosed with myasthenia gravis were assayed in the the EIASON® AChRAb ELISA. 76 (92%) were identified as being positive for AChR autoantibodies.

Lower detection limit

The negative control was assayed 20 times and the mean and standard deviation calculated. The lower detection limit at 2 standard deviations was 0.25 nmol/L

Precision

Inter assay precision (n = 20)					Intra assay precision (n = 24)				
Sample	% Inhibition	CV (%)	nmol/L	VK(%)	Probe	% Inhibition	CV (%)	nmol/L	VK(%)
1	76.4	3.3	7.7	8.7	1	90.8	0.6	13.5	2.5
2	52.4	6.7	2.0	11.1	2	45.9	2.4	1.7	5.2
3	27.3	9.4	0.62	9.4	3	25.9	7.1	0.67	8.5

Clinical accuracy

Analysis of 107 sera from patients with autoimmune diseases other than myasthenia gravis indicated no interference from autoantibodies to thyroglobulin (n=10), thyroid peroxidase (n=11), dsDNA (n=9), TSH receptor (n=40), glutamic acid decarboxylase (n=10), 21-hydroxylase (n=10), or from rheumatoid factor (n=27). Two other samples gave values of 28% (0.74 nmol/L) and 44% (1.5 nmol/L) inhibition and were from a patient with Systemic Lupus Erythematosus (dsDNA Ab positive) respectively. These samples were assayed in the IASON AChRAb RIA kit and were positive (values of 1.3 and 1.5 nmol/L respectively). In addition two samples from patients with rheumatoid arthritis (rheumatoid factor positive) were positive in the IASON AChRAb ELISA and gave values of 24% (0.77 nmol/L) and 19% (0.61 nmol/L) inhibition. The first of these samples was also positive in the IASON AChRAb RIA (5.3 nmol/L)

Assay specificity

There are no interferences concerning the following substances:

- Intralipide up to 3000 mg/dl
- Bilirubin up to 20 mg/dl
- Haemoglobin up to 500 mg/dl

LEGAL ASPECTS

Reliability of results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact IASON.

Therapeutic consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under Reliability of Results. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point Therapeutic Consequences are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

References

R. Hewer et al. A sensitive non-isotopic assay for acetylcholine receptor autoantibodies. Clinica Chimica Acta 2006 **364**: 159 - 166

This page is left blank intentionally

Pipetting scheme

Allow all reagents to reach room temperature before use

1. Pipetting	NC CAL1 – CAL4 , CO1 , CO2 , Samples in 1.5 mL Eppendorf Tubes 100 µL
2. Pipetting	AChRFOET and AChRADULT Mixture 25 µL Centrifuge for 10 s at 10-15.000 g Vortex gently Incubate overnight 16-20 hrs at 2-8°C
3. Pipetting	50 µL of each sample-AchR mixture on MPL
4. Incubation	1 h at room temperature (20-25°C) with shaking (500 rpm)
5. Washing	wash 3x : aspirate or decant add 300 µL WASH aspirate or decant and dry on an absorbent material
6. Pipetting	BIO 50 µL
7. Incubation	1 h at room temperature (20-25°C) with shaking (500 rpm)
8. Washing	wash 3x : aspirate or decant add 300 µL WASH aspirate or decant and dry on an absorbent material
9. Pipetting	SAPOD 100 µL
10. Incubation	30 min at room temperature (20-25°C)
11. Washing	wash 3x : aspirate or decant add 300 µL WASH aspirate or decant and dry on an absorbent material
12. Pipetting	SUB 100 µL
13. Incubation	30 min at room temperature (20-25°C)
14. Pipetting	STOP 50 µL
15. Reading	at 450 nm / 4Parameter or Point to Point within 30 min.

Expected Values

	nmol/L
Negative	< 0.45
Positive	≥ 0.45