



Gebrauchsanweisung

LEMS[®] N-type Assay RIA

¹²⁵I-Radioimmunoassay
zur Quantitativen Bestimmung von Autoantikörper gegen
N-Typ Spannungsabhängigen Calcium-Kanal (N-VGCC)
in Serum, Citrat, EDTA und Heparin Plasma

RUO

Art. Nr. RA121/25



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

Symbole

| | | | |
|---|----------------------|---|---|
|  | Für Forschungszwecke | | |
|  | Inhalt |  | Verwendbar bis |
|  | Chargenbezeichnung |  | Lagertemperatur |
|  | Hersteller |  | Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen |
| Art. Nr. | Bestellnummer |  | Gebrauchsanweisung beachten |

Gefahrensymbole



Radioaktiv

1. Einleitung und Testprinzip

Das LEMS® N-type Assay RIA Kit dient zur Bestimmung von N-Typ-Spannungsabhängigen Calciumkanal-Autoantikörpern (N-VGCC-Ak) in Humanserum. Der Assay ist nur für die Verwendung durch Fachpersonal und nur für Forschungszwecke bestimmt. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.

Serum-Autoantikörper, die mit N-VGCC reaktiv sind, wurden ursprünglich bei einer Dysfunktion der neuromuskulären Synapse berichtet, die speziell mit dem Lambert-Eaton-Myasthenischen Syndrom (LEMS) assoziiert ist. Anschließend wurden N-VGCC-Ak bei Erkrankungen des Zentralnervensystems nachgewiesen, einschließlich zerebellärer Degeneration und paraneoplastischer Autoimmunität, insbesondere im Zusammenhang mit kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC). Funktionelle N-VGCCs bestehen aus einer porenbildenden $\alpha 1$ -Untereinheit zusammen mit ergänzenden β -, γ - und $\alpha 2/\delta$ -Untereinheiten und werden ubiquitär im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert. N-VGCC-Ak binden hauptsächlich an die $\alpha 1$ -Untereinheit. Das Kit ist einfach zu handhaben und bietet einen spezifischen und empfindlichen Assay zur Bestimmung von N-Typ-VGCC-Ak und wurde entwickelt, um den LEMS® Assay RIA zu ergänzen, der Autoantikörper gegen P/Q-Typ-VGCCs nachweist.

Im LEMS® N-Typ Assay RIA können N-VGCC-Autoantikörper in Proben und Kontrollen mit in Detergenzien solubilisierten N-Typ-VGCCs interagieren, die aus Kaninchenhirngewebe extrahiert und mit ^{125}I -markiertem ω -Contoxin GVIA komplexiert wurden. Nach Inkubation bei 2 - 8 °C über Nacht werden die resultierenden Antigen-Antikörper-Komplexe durch die Zugabe von Anti-Human-IgG immunpräzipitiert. Nach einer zweiten Inkubation von 1,5 Stunden wird Assay Puffer zugegeben und die Proben werden zentrifugiert. Ungebundenes ^{125}I -markiertes ω -Conotoxin GVIA wird durch Absaugen des Überstands aus den Röhrchen entfernt. Die im Röhrchen verbleibende Radioaktivität ist proportional zur Antikörperkonzentration in der Testprobe.


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. | ¹²⁵I-markiertes N-VGCC | ¹²⁵I labelled N-VGCC |  | 2 Flaschen |
| | lyophilisiert, Aktivität < 15 kBq/Flasche bei Herstellung | | | |
| 4.2. | Negativ Kontrolle | Control - | | 1 Flasche |
| | 0,25 ml, gebrauchsfertig | | | |
| 4.3. | Positiv Kontrollen 1 & 2 | Control + I | Control + II | 2 Flaschen |
| | Je 0,25 ml, gebrauchsfertig, Für Konzentrationsbereiche siehe QC-Zertifikat | | | |
| 4.4. | Anti-human IgG | Anti Human IgG | | 1 Flasche |
| | 2 ml, gebrauchsfertig | | | |
| 4.5. | Assay Puffer | Assay Buffer | | 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 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
- Dest. Wasser
- Gerät zum Absaugen des Überstands
- Vortex-Mischer
- Gammazähler

5. Probengewinnung und Aufbewahrung

Zu analysierende Seren sollten bald nach dem Abseren getestet oder, vorzugsweise aliquotiert, bei 2 – 8 °C für bis zu 2 Wochen oder bei ≤ -20 °C für längere Zeit gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Lipämische oder stark hämolytische Serumproben sollte nicht verwendet werden. Citrat-, EDTA- und Heparin-Plasma können im Assay verwendet werden.

6. Vorbereitung der Proben und Reagenzien

6.1 Proben

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

Seren 1:10, d. h. 1 + 9, mit dem Assay Buffer verdünnen (z. B. 15 µl Serum + 135 µl Assay Buffer). Negativ- und Positivkontrollen nicht verdünnen, da sie 1:10 vorverdünnt und gebrauchsfertig sind. Die verdünnten Proben vor dem Assay zentrifugieren (vorzugsweise für 5 min bei 10.000 x g), um jegliches Partikelmaterial zu entfernen.

6.2 Auflösen des Tracers

Etwa 10 min vor Gebrauch die lyophilisierten Tracer ¹²⁵I labelled N-VGCC mit jeweils 0,75 ml dest. Wasser auflösen. Durch kurzes Vortexen (ca. 5 Sek.) auf einem Vortex-Mischer auflösen. Währenddessen und danach darauf achten, dass das Fläschchen aufrecht bleibt, um einen längeren Kontakt des Tracers mit dem Stopfen zu vermeiden.

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

7. Testdurchführung

Lassen Sie alle Reagenzien mit Ausnahme des **Assay Buffer** vor Gebrauch mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) stehen.

1. Je 50 µl (in Doppelbestimmung) der **Control -**, **Control + I** & **Control + II** und der 1:10-verdünnten Proben in beschriftete Röhrchen (Spitzboden-Röhrchen werden empfohlen) pipettieren.
2. 50 µl frisch rekonstituierten **¹²⁵I labelled N-VGCC** in jedes Röhrchen pipettieren.
3. Die Röhrchen vorsichtig auf einem Vortex-Mischer mischen und anschließend verschließen. Bei 2 – 8 °C für 16 – 20 Stunden inkubieren.

Zu Beginn der Inkubationszeit die Totalaktivität in mind. 2 Röhrchen für 1 Minute in einem Gammazähler bestimmen.

4. 50 µl **Anti Human IgG** in jedes Röhrchen pipettieren.
5. Die Röhrchen vorsichtig auf einem Vortex-Mischer mischen und anschließend verschließen. Bei 2 – 8 °C für 1,5 Stunden inkubieren.
6. 1 ml kalten (2 – 8 °C) **Assay Buffer** in jedes Röhrchen pipettieren und vorsichtig auf einem Vortex-Mischer mischen.
7. Die Röhrchen 20 Minuten lang bei 1.500 x g und 4 °C zentrifugieren.
8. Vorsichtig den Überstand aus den Röhrchen absaugen oder dekantieren, dabei soll das Pellet möglichst unversehrt bleiben.
9. 1 ml kalten (2 – 8 °C) **Assay Buffer** in jedes Röhrchen pipettieren und vorsichtig auf einem Vortex-Mischer mischen.
10. Die Röhrchen 20 Minuten lang bei 1.500 x g und 4 °C zentrifugieren.
11. Vorsichtig den Überstand aus den Röhrchen absaugen oder dekantieren, dabei soll das Pellet möglichst unversehrt bleiben.
12. Die Röhrchen 1 Minute lang im Gammazähler messen (cpm bestimmen).

8. Testauswertung

Die Radioaktivität im Pellet repräsentiert die Menge an ^{125}I -markiertes ω -conotoxin GVIA, das an dem N-VGCC Antikörper gebunden ist. Dies wird oft als Picomol des markierten gebundenen Toxins pro Liter Testserum ausgedrückt und die Beziehung zwischen diesem Parameter und der Radioaktivität im Pellet kann aus den folgenden Angaben berechnet werden:

- Die im Gammazähler gemessenen radioaktiven Zerfälle pro Minute cpm
- Die spezifische Aktivität A [Ci/mmol] des ^{125}I -markierten Toxins zum Zeitpunkt der Markierung
- Zerfall Faktor D für den Zerfall von ^{125}I in dem markierten toxin-N-VGCC Komplex zwischen dem Tag der Herstellung des Tracers und dem Tag der Assaydurchführung.
- Das im Assay verwendete Volumen an Probenmaterial C (C = 5 μl , da 50 μl einer 1:10 Verdünnung eingesetzt wird: s. Probenvorbereitung).
- Zähleffizienz B des verwendeten Gammazählers (z.B. 70 %, dann B = 0.7)
- Umrechnungskonstante von Curie in Zerfällen pro Minute ($2,22 \times 10^{12}$ dpm/Ci bzw. cpm/Ci)

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

Die anzuwendende (vereinfachte) Formel ist wie folgt:

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

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

| | cpm | pmol/l |
|----------|-------|--------|
| CON - | 1461 | 0 |
| CON + I | 10064 | 652 |
| CON + II | 3915 | 186 |

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 | ≤ 110 pmol/l |
| Positiv | > 110 pmol/l |

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

Seren von 59 einzelnen gesunden Blutspendern wurden im LEMS® N-VGCC Assay RIA getestet. 58 (98,3 %) wurden als negativ für VGCC-Ak vom N-Typ identifiziert.

Proben von 20 Patienten, die im LEMS® Assay RIA positiv auf P/Q-Typ-VGCC-Ak waren, wurden im LEMS® N-type VGCC Assay RIA getestet. Sechs (30 %) wurden als positiv für N-Typ-VGCC-Ak identifiziert.

Bei 30 Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen als denen mit Verdacht auf LEMS und verwandte neurologische Störungen war keiner positiv für VGCC-Ak vom N-Typ. In dieser Studie zeigten sich keine Interferenzen durch Autoantikörpern gegen GAD oder den TSH-Rezeptor im LEMS® N-type VGCC Assay RIA.

10. Literatur

- V.A. Lennon, Th.J. Kryzer, G.E. Griesmann, P.E. O'Suilleabhain, A.J. Windebank, A. Woppmann, G.P. Miljanich, E.H. Lambert
Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes.
N. Engl. J. Med. 1995;**332**:1467-1474
- M. Motomura, I. Johnston, B. Lang, A. Vincent, J. Newsom-Davis
An improved diagnostic assay for Lambert-Eaton myasthenic syndrome.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 1995;**58**:85-87

11. 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.

Pipettierschema

Lassen Sie alle Reagenzien, außer **Assay Buffer**, vor Gebrauch mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) stehen.

| | | Negativ Kontrolle | Positiv Kontrollen | Proben |
|---|----|----------------------|-----------------------|--------|
| Control - | µl | 50 | | |
| Control + I & + II | µl | | 50 | |
| Proben (verdünnt 1:10 in Assay Buffer) | µl | | | 50 |
| ¹²⁵ I labelled N-VGCC | µl | 50 | 50 | 50 |

Vorsichtig mischen (Vortex)
 Totalaktivität (cpm) in 2 Röhrchen für 1 Minute im Gammazähler
 bestimmen
 Röhrchen verschließen
 16 - 20 Stunden bei 2-8 °C inkubieren

| | | | | |
|----------------|----|----|----|----|
| Anti Human IgG | µl | 50 | 50 | 50 |
|----------------|----|----|----|----|

Vorsichtig mischen (Vortex)
 Röhrchen verschließen
 1,5 Stunden bei 2-8 °C inkubieren

| | | | | |
|---------------------|----|---|---|---|
| Assay Buffer (kalt) | ml | 1 | 1 | 1 |
|---------------------|----|---|---|---|

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

| | | | | |
|---------------------|----|---|---|---|
| Assay Buffer (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 1 Minute im Gammazähler messen (cpm bestimmen)