



RiaRSR™ VGKC Ab

Voltage-Gated Potassium Channel (VGKC) Autoantibody RIA Kit - Gebrauchsanweisung



RSR Limited

Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff
CF14 5DU United Kingdom

Tel.: +44 29 2068 9299 Fax: +44 29 2075 7770
Email: info@rsrltd.com Website: www.rsrltd.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta.

ZWECKBESTIMMUNG

Das VGKC Autoantibody RIA Kit von RSR ist zur quantitativen Bestimmung von VGKC-Autoantikörpern (VGKC-Ak) in Humanserum und nur für die Verwendung durch Fachpersonal bestimmt. Serum VGKC-Ak wurden bei Erkrankungen des peripheren Nervensystems nachgewiesen, die speziell mit dem klinischen Spektrum der erworbenen Neuromyotonie (NMT) und des Krampf-Faszikulations-Syndroms (CFS) und Erkrankungen des zentralen Nervensystems, einschließlich Morvan-Syndrom, Epilepsie und limbischer Enzephalitis (LE). Der Nachweis und die Messung von VGKC-Ak sind nützlich bei der Diagnose und Behandlung von autoimmunen spannungsabhängigen Kaliumkanalopathien und verwandten neurologischen Störungen. Das Kit ist einfach zu verwenden und bietet einen spezifischen und sensitiven Assay zum Nachweis von VGKC-Ak.

LITERATURLISTE

- I. Hart et al.
"Autoantibodies detected to expressed K⁺ channels are implicated in Neuromyotonia."
Ann Neurol **41** (1997), 238 - 246
- A. Vincent et al.
'Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis."
Brain **127** (2004), 701 - 712
- K. Tan et al.
'Clinical spectrum of voltage-gated potassium channel autoimmunity."
Neurology **70** (2008), 1883 - 1890

TESTPRINZIP

Im VGKC Ab Radioimmunoassay (RIA) von RSR interagieren VGKC-Ak in Patientenseren und Kontrollen mit in Detergenzien solubilisierten VGKCs, welche aus Kaninchenhirngewebe extrahiert und mit ¹²⁵I-markiertem α-Dendrotoxin (das bekanntermaßen mit Kv1.1, 1.2 und 1.6 Subtypen des VGKC interagiert) komplexiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 2-8°C werden die resultierenden Antigen-Antikörper-Komplexe durch die Zugabe von Anti-Human-IgG immunpräzipitiert. Nach einer zweiten Inkubation von 1 ½ Stunden wird Assay Buffer zugegeben und die Proben zentrifugiert. Ungebundene ¹²⁵I-markierte α-Dendrotoxin-VGKC-Komplexe werden mit dem Überstand aus den Röhrcchen entfernt. Die im Röhrcchen verbleibende Radioaktivität ist

proportional zur Antikörperkonzentration in der Testprobe.

AUFBEWAHRUNG UND VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN

Zu analysierende Seren sollten bald nach dem Abseren getestet oder, vorzugsweise in Aliquots, bei 2-8°C für bis zu 2 Wochen oder bei ≤-20°C für längere Zeit gelagert werden. 15 µL sind ausreichend für einen Assay. Wiederholtes Einfrieren, Auftauen oder Erhöhungen der Lagertemperatur sind zu vermeiden. Lipämische oder hämolytische Serumproben sollten nicht verwendet werden. Citrat-, EDTA- und Heparin-Plasma können im Assay verwendet werden. Falls erforderlich, Testseren bei Raumtemperatur auftauen lassen und vorsichtig mischen, um ihre Homogenität zu gewährleisten. 1:10 mit Assay Buffer verdünnen (z. B. 15 µL Serum plus 135 µL Assay Buffer). Das verdünnte Serum vor dem Assay zentrifugieren (vorzugsweise für 5 min bei ca. 10.000 rpm oder ca. 10.000 x g in einer Mikrozentrifuge), um jegliche Partikel zu entfernen.

SYMBOLE

Symbol	Bedeutung
	EG-Konformitätserklärung
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Gebrauchsanweisung beachten
	Hersteller
	Inhalt ausreichend für X Bestimmungen
	Ungeöffnet verwendbar bis
	Begrenzung der Lagertemperatur
	Negative Control
	Positive Control

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- 4,5 mL Spitzboden-Teströhrcchen aus Plastik
- Pipetten zum Dispensieren von 50 µL, 0,75 mL und 1 mL
- Reinstwasser
- Vortexmischer
- Gekühlte Zentrifuge geeignet für 1500 x g
- Gammazähler

VORBEREITUNG DER MITGELIEFERTEN REAGENZIEN

Ungeöffnete Kits und alle Kitkomponenten bei 2-8°C lagern.

A	¹²⁵I-Labelled VGKC ~ 15kBq/Fläschchen 2 Fläschchen (bei Herstellung) Lyophilisiert
	In jedes Fläschchen 0,75 mL Reinstwasser pipettieren und vorsichtig vortexen bis sich das Lyophilisat aufgelöst hat. Sofort verwenden.
B	Anti-Human IgG 2 mL Gebrauchsfertig
C	Assay Buffer 60 mL Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C aufbewahren, außer wenn in Gebrauch
D	Negative Control 0,25 mL Gebrauchsfertig
E 1-2	Positive Controls I & II 2 x 0,25 mL Gebrauchsfertig. Für Konzentrationsbereich siehe Fläschchenetikett

TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien, **außer dem Assay Buffer (C)**, für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen. Ein Mehrfachdispenser (z. B. Eppendorf Multipette®) wird für die Schritte 2, 4, 6 und 9 empfohlen.

1.	Je 50 µL (möglichst in Doppelbestimmung) verdünnte Patientenserum (1:10 in Assay Buffer verdünnt), Negative Control (D) und Positive Controls (E1-2) in beschriftete Teströhrchen pipettieren (die Controls werden fertig verdünnt geliefert).
2.	Je 50 µL frisch rekonstituiertes ¹²⁵ I-labelled VGKC (A) in jedes Röhrchen pipettieren sowie in zwei zusätzliche leere Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität.
3.	Jedes Röhrchen vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen; die Röhrchen mit einem geeigneten Deckel verschließen und 16-20 Stunden bei 2-8°C inkubieren.
4.	Je 50 µL Anti-Human-IgG (B) in jedes Röhrchen (außer Totalaktivität) pipettieren.
5.	Jedes Röhrchen vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen; die Röhrchen mit einem geeigneten Deckel verschließen und 1 ½ Stunden bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.
6.	1 mL kalten (2-8°C) Assay Buffer (C) in jedes Röhrchen (außer Totalaktivität) pipettieren und vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen.
7.	Jedes Röhrchen für 20 Minuten bei 1500 x g und bei 4°C zentrifugieren.

8.	Den Überstand absaugen oder dekantieren.
9.	1 mL kalten (2-8°C) Assay Buffer (C) in jedes Röhrchen (außer Totalaktivität) pipettieren und das Pellet vorsichtig mit einem Vortexmischer resuspendieren.
10.	Die Schritte 7 und 8 wiederholen.
11.	Bei allen Röhrchen (einschließlich Totalaktivität) mit einem Gammazähler 1 Minute lang die cpm bestimmen.

TESTAUSWERTUNG

Die Radioaktivität im Pellet stellt die Menge an ¹²⁵I-markiertem α-Dendrotoxin-VGKC-Komplex dar, der vom VGKC-Ak gebunden wird. Dies wird oft als Picomol markiertes Toxin gebunden pro Liter Testserum ausgedrückt, und die Beziehung zwischen diesem Parameter und der Radioaktivität der Pellets kann berechnet werden durch Kenntnis von (Werte für K und A befinden sich auf dem QC-Zertifikat):

- (1) der spezifischen Aktivität (K [Ci/mmol]) des ¹²⁵I-markierten α-dendrotoxin-VGKC Komplexes zum Zeitpunkt ihrer Markierung;
- (2) den Zerfallfaktor (A) des ¹²⁵I in dem markiertem α-dendrotoxin-VGKC Komplex in der Zeit zwischen ihrer Markierung und dem Tag der Assaydurchführung;
- (3) das Volumen des im Assay verwendeten Serums (C [µL]) (C = 5 µL für eine 1:10 verdünnte Probe);
- (4) die Zähleffizienz des verwendeten Gammazählers (B);
- (5) den cpm der Probe oder Positive Control minus der cpm der Negative Control (D).

Die Formel lautet folgendermaßen:

$$\text{pmol/L} = 1000 \times D \times A / C \times K \times B \times 2.22$$

TYPISCHE ERGEBNISSE (Nur als Beispiel, nicht zur Berechnung der tatsächlichen Ergebnisse verwenden)

	cpm	pmol/L
Negative Control	2041	0
Positive Control I	10827	387
Positive Control II	4874	125

ASSAY CUT-OFF

Negativ	< 72 pmol/L
Positiv	≥ 72 pmol/L

KLINISCHE BEWERTUNG

Klinische Spezifität

Seren von 100 einzelnen gesunden Blutspendern wurden im VGKC Ab RIA getestet. 98 (98 %) wurden als negativ für VGKC Ak identifiziert.

Klinische Sensitivität

Serumproben von 30 Patienten mit Verdacht auf spannungsabhängige Kaliumkanalopathien und verwandte neurologische Erkrankungen wurden im VGKC Ab RIA getestet. 27 (90 %) waren positiv für VGKC Ak.

Untere Nachweisgrenze

Die Negative Control wurde 20 Mal getestet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze betrug bei 2 Standardabweichungen 4,5 pmol/L.

Intra Assay Präzision

Probe	Mittelwert pmol/L (n = 20)	VK (%)
1	102	5,7
2	150	5,8
3	332	3,7

Inter Assay Präzision

Probe	Mittelwert pmol/L (n = 12)	VK (%)
A	89	6,6
B	138	6,4
C	320	5,4

Klinische Genauigkeit

Keiner der 138 Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, außer denen mit Verdacht auf spannungsabhängige Kaliumkanalopathien und verwandte neurologische Störungen, war positiv für VGKC-Ak, mit Ausnahme von 1 (aus 17) Patienten mit Typ-1-Diabetes (IA-2-Ak-positiv) und 2 (aus 26) Patienten mit rheumatoider Arthritis. Diese Studie zeigte keine Interferenz durch Autoantikörper gegen Thyreoglobulin, Schilddrüsenperoxidase, den TSH-Rezeptor, Aquaporin-4, 21-Hydroxylase, GAD und den Acetylcholinrezeptor im RSR VGKC Ab RIA Kit.

Interferenzen

Es wurde keine Interferenz beobachtet, wenn Proben mit folgenden Substanzen versetzt wurden: Bilirubin bis 20 mg/dL, Hämoglobin bis 500 mg/dL oder Intralipid bis 3000 mg/dL.

Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen Daten sollten nur als Richtlinie dienen. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigene Gruppe von Kontrollproben in den Assay einbezieht. Jedes Labor sollte seine eigenen normalen und

pathologischen Referenzbereiche für VGKC-Ak-Spiegel festlegen.

SICHERHEITSHINWEISE

Dieses Kit ist nur für den Gebrauch durch Fachpersonal bestimmt. Befolgen Sie die Anweisungen sorgfältig. Beachten Sie die auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten und die angegebenen Haltbarkeiten für rekonstituierte Reagenzien.

Ausführlichere Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt. Das Kit enthält radioaktives Material ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tage), emittiert ionisierende Röntgen- (28 keV) und Gamma- (35,5 keV) Strahlung. Benutzer sollten sich über alle nationalen und lokalen Gesetze und Verhaltenskodizes in Bezug auf die Verwendung, Lagerung, den Transport und die Entsorgung radioaktiver Materialien informieren und diese beachten. Vermeiden Sie alle Handlungen, die wahrscheinlich zu einer Einnahme führen. Kontakt mit Haut und Kleidung vermeiden. Schutzkleidung und gegebenenfalls Personendosimeter tragen. Radioaktive Materialien sollten nur von autorisiertem Personal und in ausgewiesenen Bereichen verwendet werden. Nach der Handhabung Hände gründlich waschen. Messen Sie Hände und Kleidung auf eine eventuelle Kontamination, bevor Sie den ausgewiesenen Bereich verlassen. Materialien menschlichen Ursprungs, die bei der Herstellung des Kits verwendet wurden, wurden getestet und als nicht reaktiv auf HIV1- und 2- und HCV-Antikörper und HBsAg befunden, sollten aber 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 Testproben, vor der Entsorgung. Die bei der Herstellung des Kits verwendeten Materialien tierischen Ursprungs stammen von Tieren, die als gesund zertifiziert wurden, jedoch sollten diese Materialien als potenziell infektiös gehandhabt werden. Einige Komponenten enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie bei allen Kit-Komponenten das Verschlucken, Einatmen, Injizieren 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 wespülen.

ASSAY PLAN

Alle Reagenzien, mit Ausnahme des Assay Buffer , vor Gebrauch mindestens 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen.	
Pipettieren:	50 µL verdünnte Patientenserum (verdünnt 1:10 in Assay Buffer) Negative und Positive Controls
Pipettieren:	50 µL ¹²⁵ I-labelled VGKC (frisch rekonstituiert) in jedes Röhrchen plus zwei zusätzliche leere Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität
Röhrchen:	Vorsichtig auf dem Vortexmischer mischen und abdecken
Inkubieren:	16 - 20 Stunden bei 2-8°C
Pipettieren:	50 µL Anti-human IgG in jedes Röhrchen (außer Totalaktivität)
Röhrchen:	Vorsichtig auf dem Vortexmischer mischen und abdecken
Incubate:	1 ½ Stunden bei Raumtemperatur (20-25°C)
Pipettieren:	1 mL kalter Assay Buffer (außer Totalaktivität)
Röhrchen:	Vorsichtig auf dem Vortexmischer mischen und abdecken
Röhrchen:	Für 20 Minuten bei 1500 x g und bei 4°C zentrifugieren
Röhrchen:	Überstände absaugen oder dekantieren
Pipettieren:	1 mL kalter Assay Buffer (außer Totalaktivität)
Röhrchen:	Auf dem Vortexmischer mischen, um das Pellet zu resuspendieren
Röhrchen:	Für 20 Minuten bei 1500 x g und bei 4°C zentrifugieren
Röhrchen:	Überstände absaugen oder dekantieren
Bei jedem Röhrchen (einschließlich Totalaktivität) 1 Minute lang die cpm mit einem Gammazähler bestimmen	