



RiaRSR™ VGCC Ab

P-Type Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) 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 RSR Voltage-Gated Calcium Channel Autoantibody Radioimmunoassay (VGCC Ab RIA) Kit ist zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern gegen den spannungsabhängigen Kalzium-Kanal vom P-Subtyp (P-Typ-VGCC-Ak) in Humanserum und nur zur Verwendung durch Fachpersonal bestimmt. Das Lambert-Eaton-Myasthenische Syndrom (LEMS) ist eine häufig mit kleinzelligem Lungenkrebs assoziierte Autoimmunerkrankung, bei der Autoantikörper gegen spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (VGCCs) gerichtet sind. Die VGCCs können anhand ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften in mindestens 4 Subtypen (T, L, N und P) eingeteilt werden. Im Fall von LEMS sind Autoantikörper gegen P-Typ-VGCCs am bedeutendsten, und dieser Kit bietet einen spezifischen und sensitiven Assay zum Nachweis dieser VGCC-Ak.

LITERATURLISTE

M. Motomura et al
 An improved diagnostic assay for Lambert-Eaton myasthenic syndrome.
 J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry (1995) 58:85-87

V. A. Lennon et al
 Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes.
 N. Engl. J. Med. (1995) 332:1467-1474.

TESTPRINZIP

Im VGCC Ab RIA von RSR dürfen VGCC-Ak in Patientenserum und Kontrollen mit in Detergenzien solubilisierten VGCCs vom P-Typ interagieren, die aus Kaninchenhirngewebe extrahiert und mit ¹²⁵I-markiertem ω-Conotoxin MVIIC komplexiert wurden. Nach einer einstündigen Inkubation werden die resultierenden Antigen-Antikörper-Komplexe durch die Zugabe von Anti-Human-IgG immunpräzipitiert. Nach einer zweiten einstündigen Inkubation wird Waschpuffer zugegeben und die Proben zentrifugiert. Ungebundenes ¹²⁵I-markiertes ω-Conotoxin MVIIC wird aus den Röhrchen durch Verwerfen des Überstands entfernt. Die im Röhrchen verbleibende Radioaktivität ist proportional zur Antikörperkonzentration in der Testprobe. Unspezifische Bindungen im Assay werden bestimmt, durch Verwendung von einer Präparation aus VGCCs markiert mit ¹²⁵I-Conotoxin MVIIC in Gegenwart eines Überschusses an unmarkiertem Conotoxin (im Kit enthalten).

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. Kein Plasma verwenden. Testseren bei Bedarf bei Raumtemperatur auftauen lassen und vorsichtig mischen, um ihre Homogenität zu gewährleisten. Seren 1:10 mit Dilution Buffer (B) verdünnen (z. B. 15 µL Serum plus 135 µL Dilution 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-Röhrchen aus Kunststoff (Glas sollte nicht verwendet werden)
- Pipetten zum Dispensieren von 25 µL, 50 µL 125 µL und 1 mL
- Gefäße zum Messen verschiedener Volumina, zum Rekonstituieren oder Verdünnen der mitgelieferten Reagenzien.
- Reinstwasser
- Vortexmischer
- Gekühlte Zentrifuge geeignet für 1500 x g
- Gammazähler

VORBEREITUNG DER MITGELIEFERTEN REAGENZIEN

Lagern Sie ungeöffnete Kits und alle Kitkomponenten bei 2-8°C.

| | | |
|----|---|---|
| A1 | ¹²⁵I-Labelled VGCC T Tracer 2 Fläschchen Lyophilisiert In jedes Fläschchen 0,7 mL Reinstwasser pipettieren und vorsichtig auf dem Vortexmischer mischen, bis sich das Lyophilisat aufgelöst hat. Sofort verwenden. | 6kBq/Fläschchen (bei Herstellung) |
| | ¹²⁵I-Labelled VGCC NSB Tracer 2 Fläschchen Lyophilisiert In jedes Fläschchen 0,7 mL Reinstwasser pipettieren und vorsichtig auf dem Vortexmischer mischen, bis sich das Lyophilisat aufgelöst hat. Sofort verwenden. | 6kBq/Fläschchen (bei Herstellung) |
| B | Dilution Buffer 10 mL Gebrauchsfertig | |
| C | Anti-Human IgG 4 mL Gebrauchsfertig (Variationen im Aussehen können auftreten, sie haben jedoch keinen Einfluss auf die Testleistung). | |
| D | Wash Solution 120 mL Gebrauchsfertig | |
| E | Negative Control 0.2 mL Vor Gebrauch 1:10 in Dilution Buffer (B) verdünnen. Zum Beispiel 15 µL Negative Control (E) + 135 µL Dilution Buffer (B) am Tag der Verwendung. | |
| | Positive Control 0.25 mL Gebrauchsfertig | |

TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien vor Gebrauch mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen. Für die Schritte 2, 4 und 7 wird ein Mehrfachdispenser (z. B. Eppendorf Multipette®) empfohlen.

| | |
|----|--|
| 1. | Patientenseren und Negative Control (E) 1:10 mit Dilution Buffer [z. B. 15 µL Serum plus 135 µL Dilution Buffer (B)] verdünnen. Positive Control (F) nicht verdünnen, diese ist gebrauchsfertig. |
| 2. | Je 25 µL verdünnte Patientenseren und verdünnte Negative Control (E) [jeweils 1:10 in Dilution Buffer (B) verdünnt] und Positive Control (F) [Positive Control ist gebrauchsfertig] in zwei Sets aus Teströhrchen (= T-Set und NSB-Set) pipettieren und das jeweils möglichst in Doppelbestimmung. |

| | |
|-----|--|
| 3. | Je 50 µL T ¹²⁵ I VGCC (A1) in jedes Röhrchen des T-Sets und je 50 µL NSB ¹²⁵ I VGCC (A2) in jedes Röhrchen des NSB-Sets pipettieren. |
| 4. | Jedes Röhrchen vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen; mit einem geeigneten Deckel verschließen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. |
| 5. | Je 125 µL Anti-Human-IgG (C) in jedes Röhrchen pipettieren. |
| 6. | Jedes Röhrchen vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen; mit einem geeigneten Deckel verschließen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. |
| 7. | Während dieser Inkubation mit jeweils 2 Röhrchen des T-Sets und 2 Röhrchen des NSB-Sets 60 Sekunden lang im Gammazähler die Totalaktivität bestimmen. |
| 8. | Jeweils 1 mL Wash Solution (D) in jedes Röhrchen pipettieren und vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen. |
| 9. | Jedes Röhrchen für 20 Minuten bei 1500 x g und bei 4°C zentrifugieren. |
| 10. | Den Überstand absaugen oder dekantieren. |
| 11. | Jeweils 1 mL Wash Solution (D) in jedes Röhrchen pipettieren und vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen, um das Pellet zu resuspendieren. |
| 12. | Die Schritte 8 und 9 wiederholen. |
| 13. | Bei allen Röhrchen mit einem Gammazähler für 120 Sekunden die cpm bestimmen. |

TESTAUSWERTUNG

Nach Subtraktion der Hintergrundstrahlung für jedes Röhrchen, stellt die Radioaktivität im Pellet mit dem T-Tracer (T cpm) die Menge an ¹²⁵I-VGCC dar, die von dem VGCC-Ak gebunden wird und die Radioaktivität im Pellet mit dem NSB-Tracer (NSB cpm) stellt die Menge an ¹²⁵I VGCC dar, die unspezifisch gebunden wird (jeweils ausgedrückt als fmol an gebundenen markierten Toxin). Diese Werte können dann in pmol markiertes Toxin gebunden pro Liter Testserum (pmol/L) umgerechnet werden, indem die spezifische Bindung für jedes Pellet berechnet und mit 400 multipliziert wird (um das Probenvolumen, den Verdünnungsfaktor sowie die Änderung der Einheit (fmol zu pmol) zu berücksichtigen). Die folgenden Informationen sind erforderlich (A und C sind auf dem QC-Zertifikat zu finden):

- (1) Der Umrechnungsfaktor für dpm in fmol (**A**).
- (2) Die Zählereffizienz des Gammazählers (**B%**).
- (3) Der Zerfallsfaktor für den Zerfall von ¹²⁵I VGCC im Zeitraum zwischen dem QC-Assay (Datum auf dem QC-Zertifikat) und dem Tag des Assays (**C**).

1. Zuerst wird für die Negative Control, Positive Controls und Testserum jeweils berechnet:

$$\text{fmol/pellet für T tracer (D)} \quad D = \frac{100 \times T \text{ cpm}}{A \times B \times C}$$

und

$$\text{fmol/pellet für NSB tracer (E)} \quad E = \frac{100 \times \text{NSB cpm}}{A \times B \times C}$$

2. Dann wird jeweils berechnet für die Positive Control (F) sowie das Testserum (F):

$$F = (D - E) \times 400$$

und für die Negative Control (G):

$$G = (D - E) \times 400$$

3. Das endgültige Ergebnis für die Positive Control (H) sowie das Testserum (H) [pmol/L an spezifisch gebundenen VGCC Ak] erhält man mit:

$$H = F - G$$

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

| | T cpm | NSB cpm | (H) final pmol/L spezifisch gebunden |
|-------------------------|-------|---------|--------------------------------------|
| Negative Control | 566 | 369 | - |
| Positive Control | 2395 | 388 | 160 |

ASSAY CUT-OFF

| | |
|----------------|-------------|
| Negativ | ≤30 pmol/L |
| Positiv | > 30 pmol/L |

Dieser Cut-off wurde bei RSR validiert. Jedoch sollte jedes Labor seinen eigenen normal und pathologische Referenzbereiche für VGCC-Ak-Spiegel festlegen. Außerdem wird empfohlen, dass jedes Labor sein eigenes Panel an Kontrollproben im Assay mitführt.

KLINISCHE BEWERTUNG

Klinische Spezifität

Proben von 160 gesunden Blutspendern wurden im VGCC Ab RIA untersucht. 160 (100%) wurden als negativ für VGCC-Ak identifiziert.

Klinische Sensitivität

Proben von 50 Patienten, bei denen LEMS diagnostiziert wurde, wurden im VGCC Ab RIA untersucht. 50 (100%) wurden als positiv für VGCC-Ak identifiziert.

Untere Nachweisgrenze

Die Negative Control wurde 20 Mal getestet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze betrug bei einer 2 Standardabweichung 2,86 pmol/L.

Inter-Assay-Präzision

| Probe | pmol/L (n=20) | VK (%) |
|-------|---------------|--------|
| 1 | 157,6 | 13,0 |
| 2 | 71,7 | 15,5 |

Intra-Assay-Präzision

| Probe | pmol/L (n=25) | VK (%) |
|-------|---------------|--------|
| 1 | 144,6 | 6,9 |
| 2 | 62,1 | 15,5 |

Klinische Genauigkeit

Es gab keine Interferenz durch Autoantikörper gegen Acetylcholinrezeptor, 21-Hydroxylase, Glutaminsäure-decarboxylase, Schilddrüsenstimulierendes Hormonrezeptor, Schilddrüsenperoxidase, Thyreoglobulin, dsDNA oder Rheumafaktor.

Interferenzen

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

Assay-Drift

Im VGCC Ab RIA wurde ein geringer Assay-Drift beobachtet. Es ist wichtig, dass die Inkubationszeiten und alle anderen Bedingungen, die in der Gebrauchsanweisung angegeben sind, eingehalten werden, um eine optimale Testleistung zu erzielen.

SICHERHEITSHINWEISE

Dieses Kit ist nur für die In-vitro-Anwendung durch Fachpersonal bestimmt. Befolgen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig. Beachten Sie die auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten und die angegebenen Haltbarkeiten für rekonstituierte Reagenzien. Ausführlichere Sicherheitsinformationen finden Sie im Material 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 zu einer Einnahme führen könnten. 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 reichlich mit Wasser nachspülen.

ASSAY PLAN

| | |
|--|--|
| Lassen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C) stehen. | |
| Verdünnen: | Patientenseren und Negative Control |
| Pipettieren: | 25 µL verdünnte Patientenseren und verdünnte Negative Control (1:10 verdünnt in Dilution Buffer) und Positive Control (gebrauchsfertig; nicht verdünnen) |
| Pipettieren: | 50 µL T ¹²⁵ I VGCC in jeweils einen Set aus 2 Röhrchen (Duplikat) und 50 µL NSB ¹²⁵ I VGCC in dem anderen Set aus 2 Röhrchen (Duplikat) für jede Testprobe und Control |
| Röhrchen: | Vorsichtig auf dem Vortexmischer mischen und abdecken |
| Inkubieren: | 1 Stunde bei Raumtemperatur |
| Pipettieren: | 125 µL Anti-human IgG in jedes Röhrchen |
| Röhrchen: | Vorsichtig auf dem Vortexmischer mischen und abdecken |
| Inkubieren: | 1 Stunde bei Raumtemperatur |
| Überprüfen: | Bei jeweils 2 Röhrchen vom T-Set und 2 Röhrchen vom NSB-Set 60 Sekunden lang im Gammazähler die Totalaktivität bestimmen. |
| Pipettieren: | 1 mL Wash Solution in jedes Röhrchen |
| Röhrchen: | Vorsichtig auf dem Vortexmischer mischen |
| Röhrchen: | Für 20 Minuten bei 1500 x g und 4°C zentrifugieren |
| Röhrchen: | Überstände absaugen oder dekantieren |
| Pipettieren: | 1 mL Wash Solution in jedes Röhrchen |
| Röhrchen: | Auf dem Vortexmischer mischen, um das Pellet zu resuspendieren |
| Röhrchen: | Für 20 Minuten bei 1500 x g und 4°C zentrifugieren |
| Röhrchen: | Überstände absaugen oder dekantieren |
| Bei jedem Röhrchen 120 Sekunden lang die cpm mit einem Gammazähler bestimmen. | |