



RiaRSR™ MuSK Ab

Muscle Specific Tyrosine Kinase (MuSK) 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 Muscle Specific Tyrosine Kinase (MuSK) Autoantibody (Ab) RIA Kit ist zur quantitativen Bestimmung von MuSK-Autoantikörpern in Humanserum und nur für die Verwendung durch Fachpersonal bestimmt. Es wurde festgestellt, dass Autoantikörper gegen das MuSK-Protein zu einem Versagen der neuromuskulären Übertragung und Muskelschwäche führen, die mit Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern (AChRAb) seronegativer Myasthenia gravis (MG) in Verbindung gebracht werden. MuSK ist ein skelettmuskelspezifisches Protein, das für die Bildung von neuromuskulären Verbindungen essentiell ist. Die Messung dieser Antikörper kann bei der Krankheitsdiagnose und -behandlung von erheblichem Wert sein.

LITERATURLISTE

W. Hoch et al
"Auto-Antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with Myasthenia Gravis without acetylcholine receptor antibodies."
Nat. Med. 2001 7 :365 – 368

I. Matthews et al
"Muscle-specific receptor tyrosine kinase autoantibodies – a new immunoprecipitation assay"
Clinica Chimica Acta 2004 348: 95 – 99

TESTPRINZIP

Im MuSK-Ab-Radioimmunoassay (RIA) von RSR dürfen MuSK-Ak in Patientenseren und Kontrollen mit ¹²⁵I-markiertem MuSK-Protein (¹²⁵I-MuSK) interagieren.

Nach Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht werden die resultierenden Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zugabe von Anti-Human-IgG immunpräzipitiert. Nach einer zweiten Inkubation von 2 Stunden werden Präzipitationsverstärker und Waschlösung zugegeben und die Proben zentrifugiert. Ungebundenes ¹²⁵I-MuSK wird mit dem Überstand aus den Röhrchen entfernt. Die im Röhrchen 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 ≤ -20°C gelagert werden. 15 µL sind ausreichend für einen Ansatz (Doppelbestimmungen). Wiederholtes Einfrieren, Auftauen oder Erhöhungen in der Lagertemperatur sind zu vermeiden. Lipämische oder hämolytische Serumproben sollten nicht verwendet werden. Verwenden Sie kein Plasma im Assay. Falls erforderlich, die Testseren auf Raumtemperatur bringen und vorsichtig mischen, um ihre Homogenität zu gewährleisten. Das Serum vor dem Assay zentrifugieren (vorzugsweise 5 Minuten lang bei ca. 10.000rpm oder bei ca. 10.000 x g in einer Mikrozentrifuge), um alle Partikel zu entfernen. Lassen Sie diesen Zentrifugationsschritt bitte nicht aus, sollten die Seren trüb sein oder Partikel enthalten.

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-Teströhrchen aus Plastik
Pipetten zum Dispensieren von 25 µL, 50 µL, 1 mL und 1,5 mL
Vortexmischer
Gekühlte Zentrifuge geeignet für 1500 x g
Gammazähler

VORBEREITUNG DER MITGELIEFERTEN REAGENZIEN

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

A	Negative Control 0,25 mL Gebrauchsfertig (vorverdünnt 1:10).
B	Positive Control 0,25 mL Gebrauchsfertig (vorverdünnt 1:10).
C	¹²⁵I-Labelled MuSK ~ 30kBq/Fläschchen 1 Fläschchen (bei Herstellung) Lyophilisiert
	1,5 mL Reconstitution Buffer (D) in das Fläschchen pipettieren und vorsichtig vortexen bis sich das Lyophilisat aufgelöst hat. Sofort verwenden.
D	Reconstitution Buffer 4 mL Gebrauchsfertig
E	Anti-Human IgG 1,5 mL Gebrauchsfertig (Variationen im Aussehen können auftreten, sie haben jedoch keinen Einfluss auf die Testleistung).
F	Precipitation Enhancer 1 mL Gebrauchsfertig
G	Wash Solution 70 mL Gebrauchsfertig

TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen. Ein Mehrfachdispenser (z. B. Eppendorf Multipette®) wird für die Schritte 2, 4, 6, 7 und 10 empfohlen.

1.	Je 50 µL Serum, verdünnt 1:10 in Wash Solution (G), 50 µL Negative Control (A) und 50 µL Positive Control (B) in beschriftete 4,5 mL Spitzbodenröhrchen aus Plastik pipettieren (Doppelbestimmung wird empfohlen). Die Negative und Positive Control werden fertig verdünnt geliefert, also nicht erneut verdünnen und immer 50 µL pro Röhrchen verwenden. Alternativ können 5 µL unverdünnte Testseren verwendet werden.
2.	Je 50 µL frisch rekonstituiertes ¹²⁵ I-labelled MuSK (C) 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 lang bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.
4.	Je 50 µL Anti-Human-IgG (E) in jedes Röhrchen (außer Totalaktivität) pipettieren.
5.	Jedes Röhrchen vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen; die Röhrchen mit einem geeigneten Deckel verschließen und 2 Stunden lang bei 2-8°C inkubieren.

6.	Je 25 µL des Precipitation Enhancer (F) in jedes Röhrchen (außer Totalaktivität) pipettieren.
7.	1 mL Wash Solution (G) in jedes Röhrchen (außer Totalaktivität) pipettieren und vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen.
8.	Jedes Röhrchen für 20 Minuten bei 1500 x g und 4°C zentrifugieren.
9.	Den Überstand absaugen oder dekantieren.
10.	1 mL Wash Solution (G) in jedes Röhrchen (außer Totalaktivität) pipettieren und das Pellet vorsichtig mit einem Vortexmischer resuspendieren.
11.	Die Schritte 8 und 9 wiederholen.
12.	Bei allen Röhrchen (einschließlich Totalaktivität) mit einem Gammazähler 1 Minute lang die cpm bestimmen.

TESTAUSWERTUNG

Die Radioaktivität im Pellet ist proportional zur Menge an markiertem MuSK, die von MuSK-Antikörpern (Ak) gebunden wird und wird als nmol gebundener markierter MuSK pro Liter Serum ausgedrückt. Dies kann unter Verwendung der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$\text{nmol/L MuSK gebunden} = \frac{(\text{cpm Probe} - \text{cpm Negative Control}) \times A}{C \times K \times B \times 2,22}$$

wobei;

A Zerfallfaktor für ¹²⁵I zwischen dem Tag der Markierung des MuSK und dem Tag der Durchführung des Assays; **B** Zähleffizienz des verwendeten Gammazählers; **C** Volumen des verwendeten Serums (µL) und **K** spezifische Aktivität (Ci/mmol) des ¹²⁵I-markierten MuSK. Die Werte für A und K befinden sich auf dem QC-Zertifikat.

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

	cpm	nmol/L
Negative Control	249	0
Positive Control	10103	0,746

ASSAY CUT-OFF

Negativ	<0.05 nmol/L
Positiv	≥0.05 nmol/L

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

KLINISCHE BEWERTUNG

Klinische Spezifität

Seren von 50 einzelnen gesunden Blutspendern wurden im MuSK Ab RIA getestet. 50 (100 %) wurden als negativ für MuSK Ak identifiziert.

Klinische Sensitivität

Serumproben von 18 Patienten mit klinischen Symptomen von MG, aber negativ für AChR Ak wurden im MuSK Ab RIA getestet. 18 (100 %) waren positiv für MuSK Ak.

Untere Nachweisgrenze

Die Negative Control wurde 20 Mal getestet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze betrug bei 2 Standardabweichungen 0,0023 nmol/L.

Intra-Assay Präzision

Probe	Mittelwert nmol/L (n = 25)	VK (%)
1	1,2	3,8
2	0,66	5,4
3	0,06	7,2

Inter-Assay Präzision

Probe	Mittelwert nmol/L (n = 20)	VK (%)
A	0,79	8,4
B	0,48	8,7
C	0,39	5,3
D	0,11	7,8
E	0,04	12,2

Klinische Genauigkeit

Die Analyse von 13 Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen als MG zeigte keine Interferenz durch Autoantikörper gegen Aquaporin-4 (n = 3), 21-Hydroxylase (n = 5) und Glutaminsäuredecarboxylase (n = 5).

Interferenzen

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

SICHERHEITSHINWEISE

Precipitation Enhancer

Signalwort: Achtung



Gefahrenhinweis(e)

H373: Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition

Sicherheitshinweis(e)

P260: Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf /

Aerosol nicht einatmen.

P314: Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Dieses Kit ist nur für den Gebrauch 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 in den Sicherheitsdatenblättern. 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 reichlich mit Wasser nachspülen.

ASSAY PLAN

Alle Reagenzien vor Gebrauch mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C) stehen lassen.	
Pipettieren:	50 µL Patientenseren 1:10 verdünnt in Wash Solution (G), 50 µL Negative (A) und Positive Control (B) (die Controls werden fertig verdünnt geliefert, nicht mehr verdünnen und immer 50 µL pro Röhrchen verwenden). Alternativ können 5 µL unverdünnte Testseren verwendet werden
Pipettieren:	50 µL ¹²⁵ I-labelled MuSK (frisch rekonstituiert (C)) in jedes Röhrchen plus zwei zusätzliche leere Röhrchen (Totalaktivität)
Röhrchen:	Vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen und abdecken
Inkubieren:	16 - 20 Stunden bei Raumtemperatur (20-25°C)
Pipettieren:	50 µL Anti-human IgG (E) in jedes Röhrchen (außer Totalaktivität)
Röhrchen:	Vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen und abdecken
Inkubieren:	2 Stunden bei 2-8°C
Pipettieren:	25 µL Precipitation Enhancer (F) (außer Totalaktivität)
Pipettieren:	1 mL Wash Solution (G) (außer Totalaktivität)
Röhrchen:	Vorsichtig auf einem Vortexmischer mischen
Röhrchen:	Für 20 Minuten bei 1500 x g und 4°C zentrifugieren
Röhrchen:	Überstände absaugen oder dekantieren
Pipettieren:	1 mL Wash Solution (außer Totalaktivität)
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 1 Minute lang die cpm mit einem Gammazähler bestimmen.	