



Arbeitsanleitung

LEMS[®] Assay RIA

**125I-Radioimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von Antikörpern
gegen den spannungsabhängigen P/Q-Calcium-
Kanal (VGCC) in Serum**



REF RA117/25

 25

 2 – 8 °C

 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. Klinische Bedeutung und Testprinzip	Seite	5
2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	6
3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien	Seite	7
4. Inhalt des Testbestecks	Seite	7
5. Probengewinnung und Aufbewahrung	Seite	8
6. Vorbereitung der Proben und Reagenzien	Seite	8
7. Testdurchführung	Seite	9
8. Testauswertung	Seite	11
9. Referenzbereich	Seite	13
10. Testcharakteristika	Seite	13
11. Literatur	Seite	14
Pipettierschema T	Seite	15
Pipettierschema NSB	Seite	16

Verwendete Symbole

 IVD	In-Vitro-Diagnostikum		CE markiert
 CONT	Inhalt		Verwendbar bis
 LOT	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
 REF	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole

 radioaktiv

1. Klinische Bedeutung und Testprinzip

Die primäre physiologische Störung beim Lambert-Eaton Syndrom (in der Literatur abgekürzt als LEMS = **L**ambert-**E**aton **M**ya**s**thene**s**ic **S**yndrom) liegt in einer verminderten Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin aus den Nervenendigungen in den synaptischen Spalt.

Ursache für diesen präsynaptischen Defekt sind Autoantikörper gegen ein Membranprotein der Nervenzelle, den spannungsabhängigen Calcium-Kanal (in der Literatur abgekürzt als VGCC = **V**oltage **G**ated **C**alcium **C**hannel).

Die typischen Symptome des LEMS ähneln sehr stark den generalisierten Symptomen der Myasthenia gravis, so daß häufig das LEMS zunächst als Myasthenia gravis fehldiagnostiziert wird. Hier kann die Bestimmung der VGCC-Antikörper differentialdiagnostisch eingesetzt werden.

Bei der überwiegenden Zahl der Patienten mit Lambert-Eaton Syndrom (ca. zwei Drittel) ist ein kleinzelliges Bronchialkarzinom assoziiert. Da die Diagnose des LEMS in der Regel der klinischen Manifestation des Tumors vorausgeht, kann das LEMS schon sehr früh einen entscheidenden Hinweis auf diese maligne Erkrankung geben.

Zur Diagnose des Lambert-Eaton Syndroms kann die radioimmunologische Messung der Autoantikörper gegen die spannungsabhängigen Calcium-Kanäle eingesetzt werden.

Das Messprinzip des LEMS[®]-Assays ist ähnlich dem des ACHRAB[®]-Assays zur Bestimmung von Antikörpern gegen den Acetylcholin-Rezeptor.

Für den Test werden mit ¹²⁵Iod radioaktiv markierte Calcium-Kanal-Proteine eingesetzt. Für die radioaktive Markierung nutzt man die Tatsache, daß dieses Membranprotein eine hohe Affinität zu Conotoxin hat. Conotoxin ist das Gift von Meeresschnecken und bindet fast irreversibel an die VGCCs.

Die Calcium-Kanal Proteine lassen sich anhand ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften in mehrere Untergruppen einteilen, die jeweils unterschiedliche Conotoxine binden. Die VGCCs vom P-Subtyp kontrollieren offenbar die Neurotransmitter-Freisetzung an der neuromuskulären Verbindung und sind wahrscheinlich das Zielantigen der Autoantikörper. Dieser Subtyp bindet das ω -Conotoxin MVIIIC aus der Meeresschnecke *Conus magus*.

Für den Test wird das ω -Conotoxin MVIIc mit ^{125}I markiert und anschließend mit den vorgereinigten VGCCs gemischt. Auf diese Weise werden die Calcium-Kanäle vom P-Subtyp selektiv indirekt markiert. Das so markierte Protein wird mit Patientenserum inkubiert. Dabei binden die vorhandenen Antikörper an das Protein. Im zweiten Schritt werden die Immunkomplexe mit Hilfe eines anti-human IgG ausgefällt. Die Radioaktivität im Niederschlag ist direkt proportional zur Menge an Antikörpern im Patientenserum.

Die Konzentrationen der Proben werden mit Hilfe der bekannten spezifischen Aktivität des Conotoxins unter Berücksichtigung der unspezifischen Bindung der individuellen Patientenprobe berechnet und in pmol/l angegeben.

2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.
- Die angegebenen Verfallsdaten sind unbedingt zu beachten.
- Einige der Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. Verschlucken und Berühren mit der Haut vermeiden.
- Für den Umgang mit radioaktiven Stoffen gelten die Vorschriften der Strahlenschutzverordnung.
- Folgende Vorsichtsmaßnahmen sind unbedingt einzuhalten:
Beim Umgang mit radioaktiven Stoffen nicht essen, trinken und rauchen. Radioaktives Material niemals mit dem Mund pipettieren. Einmalhandschuhe verwenden. Verschüttetes radioaktives Material sofort aufwischen, kontaminierte Flächen oder Gegenstände mit geeigneten Detergenzien reinigen.
- Fester und flüssiger Abfall sind gemäß StrSchV zu behandeln.
- Radioaktive Reagenzien dürfen nur an Personen abgegeben werden, die im Besitz einer gültigen Umgangsgenehmigung sind.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg, HCV bzw. HIV I/II-Antikörper ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden. Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien siehe Vorbereitung der Reagenzien. Direkte Sonneneinstrahlung ist zu vermeiden.

Das Verfallsdatum sowie die Chargenbezeichnung sind auf jedem Fläschchen bzw. Kit angegeben. Bei größeren Ansätzen möglichst nur Reagenzien einer Charge verwenden.

4. Inhalt des Testbestecks

- | | | | | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 4.1 | 125I-Tracer (T)
für die Messung der Gesamt-Bindung
Lyophilisat, Aktivität < 6 kBq,
125I- ω -Conotoxin MVIIIC markierte VCGGs | TRACER (T) |  | 2 Fläschchen |
| 4.2 | 125I-Tracer (NSB)
für die Messung der unspezifischen Bindung
Lyophilisat, Aktivität < 6 kBq,
125I-markiertes ω -Conotoxin MVIIIC und VGCCs,
gesättigt mit unmarkiertem ω -Conotoxin MVIIIC | TRACER (NSB) |  | 2 Fläschchen |
| 4.3 | Negative Kontrolle
0,2 ml, enthält normales Humanserum | CON - | | 1 Fläschchen |
| 4.4 | Positive Kontrolle
0,25 ml, 1:10 vorverdünnt, gebrauchsfertig
enthält Humanserum mit Antikörpern gegen VGCC,
Konzentrationsbereich siehe QC-Zertifikat | CON + | | 1 Fläschchen |
| 4.5 | Anti-human-IgG
4 ml, gebrauchsfertig | ANTI-HUMAN-IGG | | 2 Fläschchen |
| 4.6 | Waschlösung
120 ml, gebrauchsfertig,
enthält PBS mit 0,01 % Triton X-100 | WASH | | 1 Flasche |
| 4.7 | Verdünnungspuffer
zum Verdünnen der Proben
10 ml, gebrauchsfertig,
enthält Natriumazid (< 0,1 %) | DIL | | 1 Fläschchen |

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten 25, 50, 125 µl und 1 ml Pipetten
- Multipette mit Aufsätzen für verschiedene Volumina
- Polystyrol-Spitzboden-Röhrchen (keine Glasröhrchen)
- Zentrifuge (möglichst mit Kühlung) mit mind. 1500 x g
- Dest. Wasser
- Absaugvorrichtung oder Dekantiervorrichtung
- Vortex-Mischer
- Gamma-Counter

5. Probengewinnung und Aufbewahrung

Für den Test sollte Serum eingesetzt werden. Hämolytische bzw. lipämische Proben sollten nicht verwendet werden. Plasma sollte nicht eingesetzt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben vermeiden. Proben, die eine Trübung zeigen, sollten vor dem Test zentrifugiert werden.

Die Proben können bis zu zwei Wochen bei 2 - 8 °C im Kühlschrank oder eingefroren bei -20 °C für einen längeren Zeitraum gelagert werden.

6. Vorbereitung der Proben und Reagenzien

6.1 Patientenproben

Vor dem Test sollen die Proben auf Raumtemperatur gebracht und durchmischt werden. Es empfiehlt sich, eingefrorene Proben nach dem Auftauen kurz zu zentrifugieren, um eventuelle Schwebeteilchen zu entfernen.

6.2 Verdünnung der Patientenproben und der Negativ-Kontrolle

Patientenseren und Negativ-Kontrolle werden mit dem Verdünnungspuffer 1:10, d.h. 1+9, verdünnt (z.B. 20 µl Serum + 180 µl Puffer).

Anschließend müssen die Röhrchen mit den Verdünnungen 5 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert werden, um eventuelle Partikel abzutrennen. Der Testansatz wird dann aus dem Überstand pipettiert. Für diesen Vorgang empfiehlt es sich, wegen der geringen Volumina Spitzbodenröhrchen zu verwenden.

ACHTUNG: Die Positiv-Kontrolle ist bereits 1 : 10 vorverdünnt!

6.3 Auflösen der Tracer (T) und Tracer (NSB)

Ca. 10 Minuten vor Gebrauch werden die lyophilisierten Tracer mit je 0,7 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Die Fläschchen kurz (ungefähr 5 Sekunden) auf einem Vortex-Mischer mischen, leicht schwenken, bis sich eine homogene, leicht trübe Lösung gebildet hat und dann wieder gerade hinstellen. **Ein längerer Kontakt der Tracerlösung mit den Gummistopfen sollte vermieden werden**, da der Tracer an den Stopfen binden und so die Totalaktivität des Tracers deutlich vermindert sein kann.

Die Tracer enthalten eine Aktivität von ca. 15.000 cpm pro 50 µl.

Die Tracer sind nach Auflösen nur einige Stunden stabil und sollten sofort verbraucht werden.

7. Testdurchführung

- 7.1 Es wird von jeder Probe bzw. Kontrolle sowohl die Gesamt-Bindung als auch die unspezifische Bindung gemessen. Daher je ein Set Röhrchen für die Messung der Gesamt-Bindung (Inkubation der Proben mit dem Tracer (T)) und ein Set Röhrchen für die Messung der unspezifischen Bindung (Inkubation der Proben mit dem Tracer (NSB)) beschriften. Es empfiehlt sich, die Proben in jedem Set in Spitzbodenröhrchen und in Doppelbestimmungen anzusetzen.
- 7.2 In beiden Sets je 25 µl der positiven Kontrolle, der 1:10 verdünnten Negativ-Kontrolle und der 1:10 verdünnten Proben pro Röhrchen pipettieren.
- 7.3 In die Röhrchen für die Gesamt-Bindung je 50 µl Tracer (T) pipettieren.
In die Röhrchen für die unspezifische Bindung je 50 µl Tracer (NSB) pipettieren.
- 7.4 Röhrchen auf einem Vortex sorgfältig mischen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. Während dieser Inkubation aus jedem Set je 2 Röhrchen 1 min im Gamma-Counter messen, um die Totalaktivität der beiden Tracer (T) und (NSB) zu bestimmen.

- 7.5 Je 125 μ l anti-human IgG in alle Röhrchen pipettieren.
Sorgfältig mischen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
- 7.6 Je 1 ml Waschlösung in alle Röhrchen pipettieren und sorgfältig mischen.
Anschließend 10 Minuten bei 4.000 x g oder 20 Minuten bei 1.500 x g (möglichst unter Kühlung) zentrifugieren.
- 7.7 Überstand aus den Röhrchen vorsichtig absaugen oder dekantieren.
- 7.8 Zu jedem Röhrchen wiederum 1 ml Waschlösung geben.
Anschließend den Niederschlag mit Hilfe eines Vortex-Mischers sorgfältig aufschütteln.
- 7.9 Die Röhrchen anschließend wiederum 10 Minuten bei 4.000 x g oder 20 Minuten bei 1.500 x g (möglichst unter Kühlung) zentrifugieren.
- 7.10 Überstand aus den Röhrchen vorsichtig absaugen oder dekantieren.
- 7.11 Röhrchen 2 Minuten im Gamma-Counter messen.

8. Testauswertung

Die Berechnung der Antikörperkonzentration erfolgt unter Berücksichtigung folgender Variablen:

- Differenz aus den cpm der Gesamt-Bindung (Inkubation der Probe mit dem Tracer (T)) und den cpm der unspezifischen Bindung (Inkubation der Probe mit dem Tracer (NSB))
- Faktor D für den Zerfall von ^{125}I nach Markierungsdatum
- Verdünnungsfaktor der Probe, normalerweise = 10 (siehe Probenvorbereitung Punkt 6.2).
- Pipettiervolumen der verdünnten Probe, normalerweise = 25 μl
- Spezifische Aktivität des Toxins in dpm/fmol
- Zählausbeute des Counters Z in %

Die Berechnung der Antikörper-Konzentration erfolgt dann nach folgender Formel:

$$\frac{(\text{cpm}_{\text{T-Probe}} - \text{cpm}_{\text{NSB-Probe}}) \times D \times \text{Verd.faktor}}{\text{Pipettiervolumen } (\mu\text{l}) \times \text{spez. Aktivität} \times Z}$$

Die normalerweise verwendeten Werte für Verdünnungsfaktor (10), Pipettiervolumen (25 μl), die chargenspezifische Aktivität des Toxins (in dpm/fmol, Angabe auf dem Zertifikat) und Zählausbeute des Counters (70%, d.h. 0,7) können für jede Charge als Konstante K zusammengefasst werden.

Damit vereinfacht sich die obige Formel auf:

$$\text{Antikörper-Konzentration} = (\text{cpm}_{\text{T-Probe}} - \text{cpm}_{\text{NSB-Probe}}) \times D \times K$$

K wird dabei so berechnet, daß die Ergebnisse in pmol/Liter erhalten werden.

K ist chargenspezifisch und auf dem im Kit beigelegten Zertifikat angegeben.

D ist die Radioaktivität zum Zeitpunkt der Markierung geteilt durch die Radioaktivität zum Zeitpunkt der Testdurchführung und wird für jede Woche von der nachfolgenden Tabelle abgelesen. Der Tag der Markierung ist auf dem Zertifikat angegeben.

Woche der Testdurchführung nach Markierung	Faktor D
1. - 2.	1.12
2. - 3.	1.22
3. - 4.	1.32
4. - 5.	1.43
5. - 6.	1.55
6. - 7.	1.68
7. - 8.	1.82

War der Tag der Markierung z. B. der 01. November, so bedeutet "1. - 2. Woche nach Markierung" der Zeitraum vom 08. bis 15. November mit einem Faktor D von 1,12.

K gilt für eine Zählerausbeute des Gamma-Counters von 70 %; bei anderen Zählerausbeuten (in der Bedienungsanleitung des Gerätes angegeben) muß K entsprechend angepaßt werden.

Liegt die Zählerausbeute z.B. bei 74%, d.h. 0,74, so muß K um den Faktor $0,7:0,74 = 0,95$ korrigiert werden.

Am Ende der Auswertung wird die berechnete Konzentration der Negativkontrolle in pmol/l von allen berechneten Konzentrationen der Patientenproben und der Positivkontrolle in pmol/l abgezogen.

Die Differenz ist das Meßergebnis in pmol/l.

Berechnungsbeispiel:

Die Konstante K sei 0,114 und D sei 1,32 (3. - 4. Woche nach Markierung), so daß sich die Rechenkonstante 0,150 ergibt.

Probe	Mittelwert cpm _T	Mittelwert cpm _{NSB}	cpm _T - cpm _{NSB}	x K x D = pmol/l	Probe – Neg. Kontrolle pmol/l
Negative Kontrolle	544	429	115	17	—
Positive Kontrolle	3.167	326	2.841	426	409
Patientenserum	1.582	355	1.227	184	167

9. Referenzbereich

Als Referenzbereich wird der auch von der Universität Oxford, Großbritannien (s. Literatur M. Motomura et al., 1995) publizierte Bereich bis 40 pmol/l empfohlen. Proben mit einer Konzentration über 40 pmol/l können als positiv bewertet werden.

10. Testcharakteristika

Klinische Spezifität

Proben von 160 gesunden Blutspendern wurden im LEMS-Assay gemessen. Alle Proben waren negativ (100%).

Klinische Sensitivität

Proben von 50 Patienten mit diagnostizierten Lambert-Eaton Syndrom wurden im LEMS-Assay gemessen. Alle 50 Proben wurden positiv gefunden (100%).

Spezifität

Es konnten keine Interferenzen durch Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor, die 21-Hydroxylase, GAD, TSH-Rezeptor, TPO, Tg, dsDNA oder Rheumafaktoren gemessen werden.

Es konnten keine Interferenzen durch Zugabe von Hämoglobin bis 500 mg/dl, Bilirubin bis 20 mg/dl oder Intralipid bis 3000 mg/dl gemessen werden

Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze wurde durch eine 20fache Messung der negativen Kontrolle, Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung bestimmt. Die untere Nachweisgrenze als 2fache Standardabweichung lag bei 2,9 pmol/l.

Reproduzierbarkeit

Intra-Assay

Probe	Anzahl n	Mittelwert	VK (%)
1	25	145 pmol/l	6,9
2	25	62 pmol/l	15,5

Inter-Assay

Probe	Anzahl n	Mittelwert	VK (%)
1	20	142 pmol/l	14,6
2	20	61 pmol/l	14,3

11. 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

Pipettierschema Gesamtbindung

		T	Negativ Kontrolle	Positiv Kontrolle	Patienten
Negativ Kontrolle	µl		25		
Pos. Kontrolle	µl			25	
Verd. Serumproben	µl				25
¹²⁵ I – VGCC (T)	µl	50	50	50	50

Röhrchen sorgfältig mischen (Vortex) und 1 Stunde
bei Raumtemperatur (RT) inkubieren

Anti-human-IgG	µl		125	125	125
----------------	----	--	-----	-----	-----

Röhrchen sorgfältig mischen (Vortex) und 1 Stunde
bei Raumtemperatur inkubieren

Waschpuffer	ml		1	1	1
-------------	----	--	---	---	---

10 Minuten bei 4.000 x g oder 20 Minuten bei 1.500 x g
unter Kühlung zentrifugieren

Überstand vorsichtig absaugen oder dekantieren (außer T)

Waschpuffer	ml		1	1	1
-------------	----	--	---	---	---

Niederschlag aufschütteln (Vortex)

10 Minuten bei 4.000 x g oder 20 Minuten bei 1.500 x g
unter Kühlung zentrifugieren

Überstand vorsichtig absaugen oder dekantieren (außer T)

Röhrchen 2 Minuten im Gamma-Counter messen

Pipettierschema unspezifische Bindung

		NSB	Negativ Kontrolle	Positiv Kontrolle	Patienten
Negativ Kontrolle	µl		25		
Pos. Kontrolle	µl			25	
Verd. Serumproben	µl				25
¹²⁵I – VGCC (NSB)	µl	50	50	50	50

Röhrchen sorgfältig mischen (Vortex) und 1 Stunde
bei Raumtemperatur (RT) inkubieren

Anti-human-IgG	µl		125	125	125
----------------	----	--	-----	-----	-----

Röhrchen sorgfältig mischen (Vortex) und 1 Stunde
bei Raumtemperatur inkubieren

Waschpuffer	ml		1	1	1
-------------	----	--	---	---	---

10 Minuten bei 4.000 x g oder 20 Minuten bei 1.500 x g
unter Kühlung zentrifugieren

Überstand vorsichtig absaugen oder dekantieren (außer T)

Waschpuffer	ml		1	1	1
-------------	----	--	---	---	---

Niederschlag aufschütteln (Vortex)

10 Minuten bei 4.000 x g oder 20 Minuten bei 1.500 x g
unter Kühlung zentrifugieren

Überstand vorsichtig absaugen oder dekantieren (außer T)

Röhrchen 2 Minuten im Gamma-Counter messen