



Arbeitsanleitung

VGKC Antibody Assay RIA

**125I-Radiorezeptorassay
für die quantitative Bestimmung von Antikörpern
gegen den spannungsabhängigen Kalium Kanal
(VGKC)**



REF RA115/25

 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	3
2. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	4
3. Lagerung und Stabilität der Reagenzien	Seite	5
4. Inhalt des Testbestecks	Seite	5
5. Probengewinnung und Aufbewahrung	Seite	6
6. Vorbereitung der Proben und Reagenzien	Seite	6
7. Testdurchführung	Seite	7
8. Testauswertung	Seite	8
9. Referenzbereich	Seite	10
10. Assaycharakteristik	Seite	10
11. Literatur	Seite	11
Pipettierschema	Seite	12

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 Neuromyotonie ist ein neurologisches Syndrom, das durch eine erhöhte Erregbarkeit der Skelettmuskulatur gekennzeichnet ist und als Autoimmunerkrankung oder paraneoplastisches Syndrom bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Lymphomen und Thymomen beschrieben wurde. Ursache ist eine gestörte Funktion der neuromuskulären Synapse (motorische Endplatte), die in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle durch die Bildung von Autoantikörpern gegen spannungsaktivierte Kaliumkanäle verursacht wird (Isaac-Mertens-Syndrom). Wenn die Neuromyotonie in Verbindung mit Symptomen einer limbischen Enzephalitis auftritt, wird die Bezeichnung Morvan-Syndrom verwendet.

Die Neuromyotonie tritt sporadisch und in jedem Alter auf, sie gilt als sehr selten. Es dominieren klinisch unwillkürliche tonische Muskelverkrampfungen, Faszikulationen und als besonders charakteristisches Merkmal dauerhafte, wellenartige Muskelanspannungen, die bei schlanken Personen sichtbar sind (Myokymien). Oft kann die Muskulatur nicht richtig entspannt werden und erscheint steif (Pseudomyotonie). Bisweilen ist außerdem übermäßiges Schwitzen (Hyperhidrosis) zu beobachten. Elektromyographisch können Muskelaktionspotentiale bei Entspannung nachgewiesen werden. Bei etwa 40 % der Patienten lassen sich Antikörper gegen spannungsaktivierte Kaliumkanäle im Serum nachweisen, viele Betroffene haben auch andere Autoantikörper, zum Beispiel gegen Acetylcholinrezeptoren wie bei der Myasthenia gravis. Der vorliegenden Radioimmunoassay ist für den quantitativen Nachweis von Autoantikörpern gegen den spannungsabhängigen Kalium-Kanal (in der Literatur abgekürzt als VGKC; Voltage Gated K⁺-Channel) bestimmt.

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

Für den Test werden aus Kaninchen-Hirngewebe isolierte und mit ¹²⁵I-alpha-Dendrotoxin, das mit den VGKC Subtypen Kv 1.1, Kv 1.2 und Kv 1.6 reagiert, radioaktiv markierte VGKCs verwendet. 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 alpha-Dendrotoxins 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 2 x 0,75 ml, Lyophilisat, Aktivität < 15 kBq pro Fläschchen Lyophilisat in je 0,75 ml Aqua dest. auflösen und sofort einsetzen!	TRACER		2 Fläschchen
4.2	Negative Kontrolle 250 µl, gebrauchsfertig, enthält normales Humanserum	CONTROL —		1 Fläschchen
4.3	Positive Kontrolle 2 x 250 µl, gebrauchsfertig enthält Humanserum mit Antikörpern gegen VGKC, Konzentrationsbereich siehe QC-Zertifikat	CONTROL + I & II		2 Fläschchen
4.4	Anti-human-IgG 2 ml, gebrauchsfertig	ANTI-HUMAN-IGG		1 Fläschchen
4.5	Assaypuffer 60 ml, gebrauchsfertig	ASSAY BUFFER		1 Flasche

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten 50 µl, 75 µl und 1 ml Pipetten
- Multipette mit Aufsätzen für verschiedene Volumina
- 4,5 ml Polystyrol-Spitzboden-Röhrchen
- Zentrifuge mit Kühlung mit 3.000 x g
- Dest. Wasser
- Absaugvorrichtung oder Dekantiervorrichtung
- Vortex-Mischer
- Gamma-Counter

5. Probengewinnung und Aufbewahrung

Für den Test kann Serum, Citrat-, Heparin- und EDTA-Plasma eingesetzt werden. Hämolytische bzw. lipämische Proben sollten nicht verwendet 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 Proben auf Raumtemperatur bringen und gut durchmischen. Proben 1:10 mit Assaypuffer verdünnen, z. B. 15 µl Serum mit 135 µl Assaypuffer. Es empfiehlt sich, die verdünnten Proben kurz zu zentrifugieren, um eventuelle Schwebeteilchen zu entfernen.

6.2 Auflösen des Tracers

Kurz vor Gebrauch den lyophilisierte Tracer mit je 0,75 ml destilliertem Wasser auflösen. Den Tracer nach Auflösen sofort einsetzen.

7. Testdurchführung

- 7.1 Je 50 µl der positiven Kontrollen, der Negativ-Kontrolle und der 1:10 in Assaypuffer verdünnten Proben pro Röhrchen pipettieren.
- 7.2 In alle Röhrchen je 50 µl frisch aufgelösten Tracer pipettieren.
- 7.3 Röhrchen auf einem Vortex sorgfältig mischen, abdecken und 16 bis 20 Stunden bei 2-8 °C inkubieren.
Während dieser Inkubation 2 Röhrchen 1 min im Gamma-Counter messen, um die Totalaktivität des Tracers zu bestimmen.
- 7.4 Je 50 µl anti-human IgG in alle Röhrchen pipettieren.
Sorgfältig mischen, abdecken und 1 ½ Stunde bei Raumtemperatur (18 bis 25 °C) inkubieren.
- 7.5 Je 1 ml kalten Assaypuffer (2-8 °C) in alle Röhrchen pipettieren und sorgfältig mischen.
- 7.6 20 Minuten bei 3.000 x g unter Kühlung zentrifugieren.
- 7.7 Überstand aus den Röhrchen vorsichtig absaugen oder dekantieren.
- 7.8 Zu jedem Röhrchen 1 ml kalten Assaypuffer (2-8 °C) geben.
Anschließend den Niederschlag mit Hilfe eines Vortex-Mischers sorgfältig aufschütteln.
- 7.9 Die Röhrchen anschließend wiederum 20 Minuten bei 3.000 x g unter Kühlung zentrifugieren.
- 7.10 Überstand aus den Röhrchen vorsichtig absaugen oder dekantieren.
- 7.11 Röhrchen 1 Minute im Gamma-Counter messen.

8. Testauswertung

Die Berechnung der Antikörperkonzentration erfolgt unter Berücksichtigung folgender Variablen:

- Differenz aus den cpm der Probe und der Negativkontrolle
- Faktor D für den Zerfall von ^{125}I nach Markierungsdatum
- Pipettiervolumen der unverdünnten Probe, normalerweise = 5 μl
- Spezifische Aktivität des Toxins in Ci/mmol
- Zählrohrbeute des Counters Z in %
- Umrechnungsfaktor zwischen counts pro Minute und Curie

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

$$\frac{(\text{cpm Probe} - \text{cpm Negativkontrolle}) \times D}{\text{Pipettiervolumen } (\mu\text{l}) \times \text{spez. Aktivität} \times Z \times U}$$

Die normalerweise verwendeten Werte für Pipettiervolumen (5 μl), die chargenspezifische Aktivität des Toxins (in Ci/mmol, Angabe auf dem Zertifikat) und Zählrohrbeute des Counters (70%, d.h. 0,7) können für jede Charge als Konstante K zusammengefasst werden.

Damit vereinfacht sich die obige Formel auf:

$$\text{VGKC-Antikörper-Konz.} = (\text{cpm Probe} - \text{cpm Negativkontrolle}) \times D \times K$$

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
8.-9.	1.98
9.-10.	2.14
10.-11.	2.32

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.

Berechnungsbeispiel:

Die Konstante K sei 0,044 und D sei 1,22 (2. - 3. Woche nach Markierung), so daß sich die Rechenkonstante 0,0537 ergibt.

Probe	Mittelwert cpm	$\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Negativkontr.}}$	VGKC-Ak in pmol/Liter
Negative Kontrolle	1.673	0	0
Positivkontrolle 1	8.875	7.202	387
Positivkontrolle 2	3.995	2.322	125

9. Referenzbereich

Messungen mit Proben gesunder Blutspender ergaben einen vorläufigen Referenzbereich bis 85 pmol/l. Werte über 85 pmol/l können demnach als positiv eingestuft werden.

10. Assaycharakteristik

Klinische Spezifität

Proben von 100 gesunden Blutspendern wurden im VGKC Ak RIA gemessen. 98 Proben waren negativ (98%).

Klinische Sensitivität

Proben von 30 Patienten mit Verdacht auf Erkrankungen unter Beteiligung der spannungsaktivierten Kaliumkanäle und verwandten neurologischen Erkrankungen wurden im VGKC Ak RIA untersucht. 27 Proben wurden positiv gefunden (90%).

Spezifität

Es konnten keine Interferenzen durch Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor, die 21-Hydroxylase, Aquaporin-4, GAD, TSH-Rezeptor, TPO, Tg, gemessen werden. 1 von 17 Patienten mit Typ 1 Diabetes (IA2 Ak positiv) und 2 von 29 Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden im VGKC Ak RIA positiv gefunden.

Interferenzen

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 4,5 pmol/l

Reproduzierbarkeit

Intra-Assay

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

Inter-Assay

Probe	Anzahl n	Mittelwert pmol/l	VK (%)
1	12	89	6,6
2	12	138	6,4
3	12	320	5,4

11. Literatur

Hart et al.

“Autoantibodies detected to expressed K⁺ channels are implicated in Neuromyotonia.”

Ann Neurol 41 (1997), 238 - 246

Vincent et al.

“Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis.”

Brain 127 (2004), 701 - 712

Tan et al.

“Clinical spectrum of voltage-gated potassium channel autoimmunity.”

Neurology 70 (2008), 1883 - 1890

Pipettierschema

		T	Negativ Kontrolle	Positiv Kontrollen	Patienten
Negativ Kontrolle	µl		50		
Pos. Kontrolle I & II	µl			50	
Verd. Patientenproben	µl				50
¹²⁵ I - VGKC	µl	50	50	50	50

Röhrchen sorgfältig mischen (Vortex) und 16 - 20 Stunden bei 2 - 8 °C inkubieren

Anti-human-IgG	µl		50	50	50
----------------	----	--	----	----	----

Röhrchen sorgfältig mischen (Vortex) und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

Assaypuffer (2-8 °C)	ml		1	1	1
----------------------	----	--	---	---	---

20 Minuten bei 3.000 x g unter Kühlung zentrifugieren

Überstand vorsichtig absaugen oder dekantieren (außer T)

Assaypuffer (2-8 °C)	ml		1	1	1
----------------------	----	--	---	---	---

Niederschlag aufschütteln (Vortex)

20 Minuten bei 3.000 x g unter Kühlung zentrifugieren

Überstand vorsichtig absaugen oder dekantieren (außer T)

Röhrchen 1 Minute im Gamma-Counter messen