

PRACOVNÍ POSTUP

Pracovní postup

**Anti-Myelin Associated Glycoproteins
(anti-MAG) Western Blot Immunoassay
REF IM-1173**

Obsah

1. Použití	2
2. Klinické využití a princip metody	2
3. Uchovávání, skladování a exspirace	2
4. Složení soupravy (kitu)	3
5. Získání vzorků, manipulace a uchování	3
6. Postup	3
7. Interpretace výsledků	4
8. Očekávané výsledky	5
9. Charakteristika	5
10. Návod k řešení problémů	6
11. Literatura	6

A : schéma pipetování

1. Použití

Tato metoda (*Western Blot*) je určena pro detekci autoprotilátek primárně namířeným proti glykoproteinům asociovaným s myelinem (anti-MAG), a také dalších glykolipidových autoprotilátek v lidském séru.

2. Klinické využití a princip metody

Autoimunitní odpovědi periferního nervového systému, známé jako periferní neuropatie, jsou manifestací spojenou s přítomností autoprotilátek proti různým neurálním glykokonjugátům. Tyto neuropatie mohou být akutní, chronické, zahrnují axonální degeneraci nebo demyelinizaci. Autoimunitní neuropatie mohou být dále rozděleny na monoklonální gamopatie a polyklonální zánětlivé polyneuropatie, jako Guillain-Barré syndrom, Chronická zánětlivá demyelinizující polyradikuloneuropatie (CIDP), Multifokální motorická neuropatie (MMN), a paraneoplastické neuropatie. U těchto onemocnění je významný současný výskyt autoantigenů, které zprostředkovávají patogenní mechanizmy.

Při těchto neuropaticích bývají nacházeny následující autoprotilátky specifické pro periferní nervy ¹⁻⁶:

- a) anti-myelin associated glycoprotein (MAG, s myelinem asociovaný glykoprotein),
- b) anti-acidic glycolipids (protilátky proti glykolipidům - SGPG, sulfoglucuronyl paragloboside a další),
- c) anti-gangliosides (protilátky proti gangliosidům),
- d) anti-compact myelin associated proteins (s myelinem asociované proteiny jako P0, P2, a periferní myelinový protein 22 (PMP22))

Epitop (HNK1) rozpoznávaný lidskými anti-MAG autoprotilátkami je sulfátovaný oligosacharid. Stejný epitop je sdílen autoprotilátkami proti SGPG, P0 a PMP22 ⁷. Neuropatie související s výskytem anti-MAG IgM paraproteinémie obvykle představují různorodou skupinu onemocnění, která pomalu progreduje, vykazují příznaky demyelinizace a variabilní stupeň axonální degenerace často doprovázený ataxii. 50% všech periferních neuropatií s přítomností IgM paraproteinémie vykazuje přítomnost anti-MAG protilátek. Zdá se, že tyto protilátky mohou interferovat v procesu myelinizace, s regenerací myelinu, nebo s interakcemi Schwanova buňka – axon. Proto je detekce těchto autoprotilátek pro kliniku velmi důležitá, jelikož ukazuje na aktivní demyelinizaci při periferní neuropatii.

Tato WB metoda poskytuje citlivý způsob simultánního screeningu a potvrzení přítomnosti autoprotilátek proti různým neurálním antigenům souvisejícím s myelinem. Reakce s anti-MAG mohou být snadno pozorovány již v oblasti 100 kD. Jestliže vzorek nevykáže na proužku žádnou imunoreaktivitu, výsledek by měl být interpretován jako negativní.

Princip stanovení

Nejprve je třeba inkubovat proužky se zředěným sérem pacienta. Protilátky se specificky váží na s myelinem asociované抗原 na proužku. Po důkladném promyti proužku a inkubaci s kožním anti-human IgM konjugátem jsou proužky opět promyty a poté inkubovány se substrátem. Pozitivní reakce s Anti-MAG se zobrazí jako modrofialové pásy v oblasti 100 kD.

3. Uchovávání, skladování, exspirace

Uchovávejte všechny reagencie v originálních obalech při teplotě 2-8 °C. Nezmrazujte. Nepoužívejte tekuté reagencie, jsou-li zakalené, nebo obsahují precipitát. Pro optimální výkonnost testu umožněte všem komponentám dosáhnout před použitím pokojové teploty (cca 22°C). Proužky s antigeny mohou být použity pouze jednou. Nesměšujte a nenahrazujte reagencie s odlišnými čísly šarže. Nepoužívejte reagencie po uplynutí expirační doby uvedené na každé komponentě.

Doporučení a bezpečnostní opatření

Veškerý materiál lidského původu použitý pro výrobu této soupravy (kontroly, standardy atd.) byl schválenými metodami testován a potvrzen negativním na HbsAg, Hepatitis C a HIV 1. Nicméně žádný test nemůže garantovat úplnou absenci virových agens v takovýchto materiálech. Proto zacházejte s kontrolami, standardy a vzorky sér pacientů jako s potenciálně infekčními materiály v souladu s platnými předpisy.⁹

VÝSTRAHA

Azid sodný (NaN_3) může reagovat s olověnými a měděnými materiály a tvořit vysoce explozivní azidy kovů. Ihned po vylítí tekutin vypláchněte nádobky velkým množstvím vody a zabraňte tak vzniku azidů. NaN_3 je při pozření toxický. Ihned referujte tyto příhody vedoucímu laboratoři nebo toxikologickému centru.

Postupujte vždy dle předpisů pro správnou laboratorní praxi a minimalizujte mikrobiální a křížovou kontaminaci reagencí.

4. Složení soupravy (kitu)

ImmunoBlot anti-MAG Western Blot

Kit obsahuje dostatečné množství reagencí k provedení 20 stanovení.

1 x 20	<i>Western Blot</i> proužky
1 x 110 ul	*anti-MAG pozitivní kontrola (fialové víčko lahvičky)
1 x 110ul	*negativní kontrola (žluté víčko lahvičky)
1	kontrolní karta
1 x 240 ul	*kozí anti-human IgM konjugát (modré víčko lahvičky)
1 x 60 ml	*ředící roztok
1 x 25 ml	substrát (žlutá lahvička)
1 lahvička	*práškový promývací roztok (rekonstituujte v jednom litru deionizované nebo destilované vody)
3	vaničky
2	tiskopisy

* Jako konzervans je použit azid sodný < 0,1% (T+, R 28 – 32, S ½ - 28 – 45).

Další potřebný materiál (nedodávaný se soupravou)

- čistý 1000 ml odměrný válec
- nůžky s hladkým ostřím
- kívací anebo rotační třepačka
- absorpční papír nebo papírové ručníky
- deionizovaná nebo destilovaná voda
- stlačitelná láhev na uchování naředěného promývacího roztoku
- pipety o velikosti 10 – 1000 ul
- jednorázové špičky na pipety
- budík

5. Získání vzorku, manipulace a uschovávání

Měly by být používány pouze vzorky séra. Nepoužívejte ikterické, lipemické, hemolyzované nebo bakteriemi kontaminované vzorky – mohou interferovat s provedením testu. Uchovávejte vzorky v těsně uzavřené zkumavce při teplotě 2-8 °C max. 1 týden, pro delší uschování pak zamražte na teplotu –20 °C. Vyvarujte se opakovaného zamražování a rozmrázování vzorků.

6. Postup

- před započetím práce s metodou pozorně přečtěte návod
- ponechte reagencie před započetím práce ekvilibrovat při pokojové teplotě cca 30 minut. Všechny nepoužité vzorky a reagencie vraťte rychle po použití do chladničky
- k úspěšnému provedení metody je nutná správná technika promývání
- manipulujte s proužky pouze pomocí pinzety. Nedotýkejte se proužků holýma rukama.
- proužky jsou jednotlivě číslovány na spodní straně. Přiřaďte číslům vzorků odpovídající čísla proužků a vypište do přiloženého tiskopisu
- před zahájením pipetování uveděte do tiskopisu všechny ostatní potřebné informace

Postup metody

- Krok 1** za použití anatomické pinzety umístěte požadované množství proužků označenou stranou nahoru do jednotlivých jamek vaničky
- Krok 2** napipetujte do každé jamky 1,0 ml ředícího roztoku
- Krok 3** napipetujte do příslušných jamek 10 ul pozitivní a negativní kontroly a vzorků pacientů tak, aby jste získali ředění 1:101. Inkubujte 60 minut (+/- 5minut) při pokojové teplotě na třepačce
- Krok 4** odsajte roztok z jamky do odpadového kontejneru. Důkladně promyjte proužky promývacím roztokem vystříknutím cca 2 ml roztoku přímo na proužek. Promývejte proužky jemným mícháním 5 minut a poté roztok odsajte do odpadového kontejneru. Zopakujte 3x.
Pozor: Důkladné promytí prožků mezi jednotlivými inkubacemi je zásadním bodem k získání hodnotných výsledků. Nesprávné promývání má za následek vysoké zabarvení pozadí.
- Krok 5** napipetujte 1,0 ml ředícího roztoku a následně 10 ul konjugátu do každé jamky. Inkubujte 30 minut (+/- 5 minut) při pokojové teplotě na třepačce
- Krok 6** opakujte krok 4
- Krok 7** napipetujte 1,0 ml substrátu do každé jamky a inkubujte při jemném promíchávání 15 minut (+/- 5 mint) při pokojové teplotě a tlumeném světle
- Krok 8** opakujte krok 4, ale promyjte dvakrát místo čtyřikrát
- Krok 9** za použití anatomické pinzety odstraňte proužky z vaniček a jemně je položte na absorbční papír. Dotýkejte se proužků pouze na jejich koncích a ponechejte je 15-20 minut schnout

Kontrola kvality:

Protože kontrolní karty jsou specifické pro každou šarži, musí být negativní a pozitivní kontrola provedena při každém stanovení, aby byla zajištěna správná interpretovatelnost metody.

Pozitivní kontrola: v oblasti 100kD by se měl objevit intenzivní a difuzní modrofialový pásek, který představuje anti-MAG reakci. Mimo tyto interní referenční markery se na proužku pozitivní kontroly objeví také modrý marker v oblasti 35 kD (viz. obr 1).

Negativní kontrola: Negativní kontrolní reakce se projeví jako modrofialový pásek v oblasti 35 kD (viz. obr. 2).

7. Odečítání a interpretace výsledků

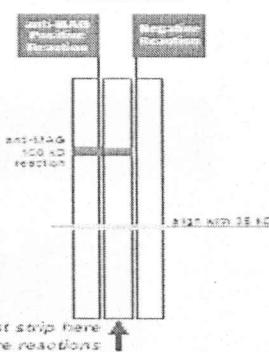
Proužky ImmuBlot obsahují s myelinem asociované glykoproteiny molekulární hmotnosti 100 kD. Poloha 35 kD proteinu slouží jako marker a pomáhá k přiložení proužků na kontrolní kartu (viz. obr. 2).

- Krok 1** držte testovací proužek s vzorkem mezi proužky pozitivní a negativní kontroly na poskytnuté laminátové kontrolní kartě a vyrovnejte testovací proužek podle 35 kD markeru jako referenčního bodu (viz. obr. 2).
- Krok 2** Porovnejte reakce testovacího proužku s oběma kontrolami
- Krok 3** Jestliže pásy na testovacím proužku souhlasí s 100 kD pásy na pozitivní kontrole, jedná se o anti-MAG reakci. Taková reakce by měla být považována za pozitivní. Pozitivní výsledky se mohou zobrazovat s různou intenzitou, od slabé po silnou. Slabé reakce by měly být srovnány se základní intenzitou reakce na proužku negativní kontroly. Obrázek 2 představuje příklad dobře přiložených proužků a pozitivního výsledku.
- Krok 4** Jestliže nejsou na testovacím proužku zřetelné žádné pásy, anebo jsou-li tam pásy nekorespondující ani s anti-MAG (100 kD) reakcí kontrolní karty, měly by být vzorky považovány za negativní.

Figure 1



Figure 2
ImmunoBlot™ anti-MAG ab.
Western Blot



8. Očekávané výsledky

Incidence of anti-Nerve (anti-MAG) Antibodies in Neuropathies¹⁰

Disorder	n	positive	% positive
Polyneuropathy+ IgM gammopathy	40	26	65
Demyelinating neuropathies	33	26	78
Axonal neuropathy	6	0	0

Association of anti-MAG Antibody Titers with Progression to Clinical Neuropathy¹¹

anti-MAG Titer	no neuropathy n=17	subclinical n=7	confirmed clinical n=6
High 1:25,000,000 to 1:100,000	1	3	3
Low 1:6,400 to 1:200	6	2	1
Negative <1:10	10	2	2

9. Charakteristika

Souprava ImmuBlot anti-MAG antibody Western Blot by měla být používána jako pomoc při diagnostice. Pozitivní výsledky mohou být zachyceny u jiných autoimunitních onemocnění a/nebo u některých infekčních nemocí. Proto by výsledky měly být vždy hodnoceny a interpretovány klinikem nebo neurologem ve vazbě na pacientovu anamnézu, klinická vyšetření a výsledky dalších laboratorních testů. Některá séra mohou přiležitostně reagovat na MW marker (molecular weight), význam není zřejmý.

10. Návod k řešení problémů

Silné pásy na proužku negativní kontroly – Pravděpodobná příčina – kontaminovaná lahvička negativní kontroly, nebo křížová kontaminace z jamek obsahující pozitivní sérum.

Proužek pozitivní kontroly vypadá jako proužek negativní kontroly – Pravděpodobná příčina: Lahvička negativní kontroly byla zaměňena za lahvičku s pozitivní kontrolou.

Proužky jsou kompletně bez pásů – Pravděpodobná příčina: bylo opomenuto přidání konjugátu nebo substrátu.

Vysoké zabarvení pozadí a špatný kontrast mezi pásy a pozadím – Pravděpodobná příčina: byly opomenuty kroky promývání, anebo bylo promývání nekvalitní, anebo byly příliš dlouhé inkubace.

11. Literatura

1. Quarles RH, and Weiss MD. Autoantibodies associated with peripheral neuropathy. *Muscle & Nerve*; 22:800-822, 1999.
2. Griffin J. Antiglycolipid antibodies and peripheral neuropathies:links to pathogenesis. *Prog Brain Res*; 101: 313-323, 1994.
3. Quarles RH. Glycoproteins of the myelin sheaths. *J. Mol. Neurosci*; 8:1-12, 1997.
4. Kanda T, Yoshino H, Ariga T et al. Glycosphingolipid antigens in cultured bovine brain microvascular endothelial cells: Sulfoglucuronosyl paragloboside as a target of monoclonal IgM in demyelinative neuropathy. *J. Cell Biol*; 126:235-246, 1994.
5. HammerJA, O'Shannessy DJ, and De LM et. al. Immunoreactivity of PMP-22, P0, and other 19 to 28kDa glycoproteins in peripheral nerve myelin of mammals and fish with HNK1 and related antibodies. *J. Neurosci Res*; 35:546-558, 1993.
6. Baba H, Daune GC, Ilyas AA et. al. anti-GM1 ganglioside antibodies with differing fine specificities in patients with multifocal motor neuropathy. *J. Neuroimmunol*; 25:143-150, 1989.
7. Field MC, Wing DR, Dwek RA et. al. Detection of multisulfated N-linked glycans in the L2/HNK1 carbohydrate epitope expressing neural adhesion molecule P0. *J. Neurochem*; 58:993-1000, 1992.
8. Latov N. Pathogenesis and therapy of neuropathies associated with monoclonal gammopathies. *Ann. Neurol*; 37:S32-S42, 1995.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control, National Institute for Health. (HHS Pub. No {CDC} 93-8395) 1993.
10. Chassande B, Leger JM, Younes-Chennoufi AB et al. Peripheral neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy: Correlations between M-Protein antibody activity and clinical/electrophysiological features in 40 cases. *Mus and Nerve*; 55-62, 1998.
11. Meucci M, Baldini L, Cappellari A et al. Anti-Myelin associated glycoprotein antibodies predict the development of neuropathy in asymptomatic patients with IgM monoclonal gammopathy. *Ann Neurol*; 46:119-122, 1999.