ImmuGlo™
Anti-Neuronal Antibody IFA

CE **IVD**

NÁVOD K POUŽITÍ

REF 1111 48 stanovení (8 x 6)

POUŽITÍ

Nepřímý imunofluorescenční (IFA) test k semikvantitativní detekci antineuronálních (*paraneoplastických*) protilátek; anti-Yo, anti-Hu a anti-Ri v lidském séru
.

ÚVOD

Autoimunitní odpovědi centrálního nervového systému (CNS), označované jako paraneoplastické neurologické syndromy, jsou protinádorovou odpovědí. Zahrnují různé neurologické poruchy jako např. *Paraneoplastická encefalomyelitida (PE)*, *Paraneoplastická senzorická neuropatie (PSN)*, *Paraneoplastická cerebrální degenerace (PCD), Paraneoplastiká opsoklonus-myoklonus ataxie (POMA)* a *Stiffmannův syndrom* [1-3]. Spolehlivá diagnostika takových projevů a detekce nádoru je velmi obtížná, avšak u významného počtu případů ve skutečnosti není nádor objeven až při propuknutí neurologických symptomů [4,5]. Paraneoplastické syndromy jsou charakterizovány přítomností neuronálních protilátek v séru pacienta. Detekce těchto protilátek je velmi užitečná pro lékaře, neboť představují přítomnost nádoru. Nádory, které jsou známy jako příčina paraneoplastických syndromů jsou malobuněčný karcinom plic, neuroblastom, karcinom prsu, vaječníků a varlat.
Následující autoprotilátky jsou spřažené s paraneoplastickým syndromem [6-8]:

a) **Anti - Hu**, Typ I antineuronálních nukleárních protilátek (ANNA-1) je asociován s malobuněčným karcinomem plic (SCLC) vyúsťující v paraneoplastickou encefalomyelitidu (PE).
b) **Anti -Yo**, protilátky proti puřkyňovým buňkám (PCA-1) jsou asociovány s karcinomem prsu a vaječníků vyúsťující v paraneoplastickou cerebrální degeneraci (PCD).
c) **Anti - Ri**, Typ II antineuronálních nukleárních protilátek (ANNA-2) je asociován s neuroblastomem u dětí, karcinom vejcovodů nebo prsu vyúsťující v paraneoplastikou opsoklonus-myoklonus ataxií (POMA).

Přítomnost jedné z těchto protilátek podporuje klinickou diagnózu paraneoplastického syndromu a vede k cílenému hledání novotvaru. Tyto markery také pomáhají určovat, zda se jedná o skutečný paraneoplastický syndrom nebo o jiné zánětlivé onemocnění nervového systému klinicky se podobající paraneoplastickému syndromu.
Nepřímá imunofluorescence tak poskytuje citlivou metodu detekující tyto autoprotilátky.
Anti-Hu / anti-Ri autoprotilátky, které charakteristicky barví jádra granulárních buněk, jsou snadno odlišitelné od Anti-Yo protilátek barvících cytoplasmu purkyňových buněk. Nicméně k usnadnění rozlišení mezi Hu a Ri autoprotilátkami byl navržen trojitý substrát. Tento trojitý substrát identifikuje a eliminuje antinukleární protilátky při specifickém screeningu protilátek. V případě, že vzorek

nevykazuje žádnou reaktivitu, výsledek je vyhodnocen jako negativní. Specifita u IFA pozitivních vzorků může být určena pomocí western blotu.

PRINCIP TESTU

Protilátky Hu (ANNA 1), Yo1 (PCA-1), a Ri (ANNA2) jsou detekovány pomocí nepřímé imunofluorescence využívající jako substrát tkáňové řezy opičího mozečku, potkaního střeva a jater. U této metody jsou séra pacientů inkubována jednotlivě pro umožnění specifické vazby protilátek na antigeny substrátu.
Další imunoglobuliny a jiné sérové proteiny se nenavazují a jsou odstraněny během promývacího kroku. Navázané protilátky třídy IgG jsou detekovány při inkubaci s fluorescein-značeným anti-lidským IgG konjugátem. Reakce je pozorována pod fluorescenčním mikroskopem vybaveným příslušným filtrem. Přítomnost protilátek je určena specifickou reakcí s cerebrálními neurony (purkyňovy, molekulární nebo granulární buňky) a myenterickým plexem ve střevě.

SKLADOVÁNÍ A PŘÍPRAVA

Všechny reagencie skladujte při teplotě 2 - 8°C. Reagencie jsou připraveny k použití po vytemperování na laboratorní teplotu.

SOUČÁSTI SOUPRAVY

ImmuGlo™ anti-Neuronal IFA 1111
Kit obsahuje dostatečné množství reagencií pro provedení 48 stanovení.

8 x	**SORB SLD 6**	**6 jamek se substrátem cerebellum (potkan)/intestine/liver**
1 x 0.5 ml	**CONTROL + HU***	**Hu (ANNA-1) Pozitivní kontrola.**
1 x 0.5 ml	**CONTROL - ***	**Negativní kontrola.** Obsahuje lidské sérum.
1 x 5 ml	**IgG CONJ.FITC EB***	**Anti-lidský IgG FITC konjugát.** Připraven k použití. **Chraňte před světlem.**
1 x 60 ml	**BUF ***	**Ředící pufr.**
2 vials	**BUF WASH**	**Fosfátový pufr (PBS).** Rozpusťte vialku v 1 litru vody.
1 x 5.0 ml	**MOUNTING MEDIUM***	**Montovací medium.** Nezmrazujte.
1 x 12	**COVER SLD**	**Krycí sklíčka.** Rekonstituujte v 1 litru vody.

***** Obsahuje < 0.1% NaN3

Doplňkové komponenty

1 x 5 ml	**IgG-CONJ FITC ***	**Kozí antilidský IgG FITC konjugát.** Připraven k použití. **Chraňte před světlem.** (REF 2099X)
1 x 1.0 ml	**EVANS**	**Evan's Blue** (Evansova modř pro zvýšení kontrastu). (REF 2510)

POŽADOVANÝ, ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL

Fluorescenční mikroskop
Mikropipeta nebo Pasteurovy pipety
Sérologické pipety
Barvící miska (např. Coplinova nádoba)
Malé zkumavky (např. 13 x 75 mm) a stojan na zkumavky
Deionizovaná nebo destilovaná voda

1 litrový kontejner
Promývací láhev
Absorpční papírové ručníky
Inkubační komůrka

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Pouze pro *in vitro* diagnostiku. Všechny použité lidské komponenty byly testovány na HbsAg, HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV-I a byly shledány negativní výsledky dle FDA. Se vzorky nakládejte jako s potenciálně biologicky nebezpečným materiálem. Postupujte dle správné laboratorní praxe při manipulaci, skladování, výdeji a likvidaci tohoto materiálu.

UPOZORNĚNÍ - Azid sodný (NaN3) může reagovat s olovem a mědí za vzniku vysoce výbušných azidů. Při odstraňování kapalin vypláchněte vše velkým množstvím vody tak, aby se zabránilo nahromadění velkého množství azidu. Azid sodný může být po požití toxický. V případě požití okamžitě kontaktujte vedení laboratoře a lékaře.
Postupujte přesně dle uvedených instrukcí k zajištění platných výsledků. Nepoužívejte nebo nemíchejte reagencie z různých souprav a šarží.
Nepoužívejte po uplynutí doby expirace.

ODBĚR VZORKU A JEHO SKLADOVÁNÍ

Pouze vzorky séra by měly být použity pro tento postup. Silně hemolyzované, lipemické nebo mikrobiologicky kontaminované vzorky mohou ovlivnit výsledky tohoto testu, proto nemohou být použity. Vzorky mohou být skladovány při teplotě 2 - 8 °C maximálně 1 týden. Pro skladování po delší dobu sérum zamrazte a uchovávejte při teplotě -20 ° C. Rozmrazené vzorky znovu nezmrazujte.

POSTUP

Pracovní postup

A. Screening

1. Nařeďte každé sérum pacienta v poměru **1:10** ředícím pufrem **Buffered Diluent** (0.1 ml séra + 0.9 ml Diluentu). **Neřeďte** Pozitivní ani Negativní kontroly! Uložte neředěné sérum pro případné stanovení titrů protilátek, pokud bude screeningový test pozitivní.
2. Sáčky obsahující sklíčka nechte temperovat při laboratorní teplotě 10-15 minut. Opatrně vyjměte sklíčka, nedotýkejte se přitom substrátu!
3. Sklíčka označte a umístěte je do inkubátoru na papírový ručník navlhčený vodou, aby se zabránilo vysychání.
4. Obraťte lahvičku s kapátkem a jemně zmáčkněte pro nakápnutí 1 kapky (přibližně 50 µl) **negativní kontroly** do 1. jamky a 1 kapku **pozitivní kontroly** do 2. jamky. Vyvarujte se přeplnění jamek.
5. Mikropipetou nebo Pasteurovou pipetou aplikujte **1 kapku** (priblizne 50 µl) naředěného pacientova **séra** do ostatních jamek. Vyvarujte se přeplnění jamek.
6. Sklíčko inkubujte **30 minut** při laboratorní teplotě v inkubační komůrce zakryté víkem.
7. Vyjměte sklíčko z inkubační komůrky, držte jej za okraj a jemně **opláchněte** asi 10 ml **PBS** za pomocí pipety nebo opláchněte sklíčko v kádince s PBS. Nepoužívejte promývací láhev. Poté ihned přeneste sklíčko do Coplinovy nádoby a promývejte 10 minut PBS. Proces opakujte u všech sklíček.
8. Vyjměte sklíčko z Coplinovy nádoby. Absorpčním papírem vysušte přebytečné PBS z okraje sklíčka. Umístěte sklíčko do inkubační komůrky a ihned aplikujte **1 kapku** (přibližně 50 µl) **konjugátu** do každé jamky.
9. Přemístěte sklíčko do inkubační komůrky. **Inkubujte** po dobu **30 minut** při laboratorní teplotě.

10. Vyjměte sklíčko z inkubační komůrky. Držte sklíčko za okraj a **ponořte** jej do kádinky s **PBS** pro odstranění přebytečného konjugátu. Umístěte sklíčko do nádobky naplněné PBS na **10 minut**. Je-li třeba, přidejte **2-3 kapky Evan´s Blue** barviva do konečného promývání. Opakujte postup u všech sklíček.

POZNÁMKA: Nesprávné promytí může vést ke zvýšení fluorescence na pozadí.

11. Vyjměte sklíčko z promývací nádoby. Absorpčním papírem vysušte přebytečné PBS z okraje sklíčka. Pro zabránění vysušení sklíčka pokračujte ihned dalším krokem, dokud je sklíčko mokré. Kápněte 3 kapky montovacího media na krycí sklíčko a opatrně převraťte na podložní sklíčko. Jemně přitlačte pro odstranění případných bublin. Zabraňte dalšímu pohybu krycího sklíčka.

12. Zkoumejte specifickou fluorescenci pod fluorescenčním mikroskopem při zvetšení 200x nebo větším.

Sklíčka by měla být odečtena co nejdříve po testu. Nicméně, vzhledem k přítomnosti krycí tekutiny v montovacím mediu, nedochází k žádné

významné ztrátě intenzity barvení, jestliže dojde k odečtení do 48 hodin. Sklíčka musí být skladována při teplotě 2-8°C ve tmě.

B. Endpoint stanovení (titrace)

Pozitivní sérum ve screeningovém testu může být dále testováno kroky 4 až 15 k určení titru. Každý proces testování by měl zahrnovat pozitivní a negativní kontroly. Řeďte dvojnásobnou ředící řadou začínající 1:10 (viz níže). Použijte jedno sklíčko, kde sérum může být ředěno v poměrech 1:10 až 1:320. V případě pozitivity u ředění 1:320, je titr vyhodnocen jako větší nebo roven 320. Další sklíčko může být použito pro určení endpointu při pozitivitě séra i při ředění 1:320. Převrácená hodnota nejvyššího ředění vytvářející pozitivní reakci je titr.

Příprava ředění

Zkumavky označte čísly 1-6. Přidejte 0,9 ml Diluentu do zkumavky č. 1 a 0.2 ml do zkumavky č. 2-4. Pipetujte 0.1 ml neředěného séra do zkumavky č. 1 a důkladně promíchejte. Přeneste 0.2 ml ze zkumavky č. 1 do zkumavky č. 2 a důkladně promíchejte. Pokračujte přenesením 0.2 ml z jedné zkumavky do následující po promíchání tak, aby vzniklo ředění, které je znázorněno v následující tabulce.

Zkumavka	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Sérum	0.1 ml					
Buffered Diluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Přenesení	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml odstraňte
Výsledné ředění	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320

KONTROLA KVALITY

V každém testu by měla být zahrnuta pozitivní i negativní kontrola. Negativní kontrola by neměla ukázat žádnou specifickou fluorescenci neuronů, přičemž pozitivní kontrola by měla mít 1+ nebo vyšší barevnou intenzitu této struktury. Jestliže nejsou získány tyto očekávané výsledky, měl by být proces zopakován. Pokud nadále dochází k selhání kontrol, může to být způsobeno:

- Zákalem - vyřaďte kontrolu a použijte novou
- Problémy s optickým systémem fluorescenčního mikroskopu - nesprávné nastavení, žárovka za hranicí životnosti atd.
- Možné vyschnutí sklíčka během procesu

VÝSLEDKY

Výsledky testu pro anti-neuronální protilátky by měly být interpretovány jako negativní (<10) nebo pozitivní nebo pozitivní se specifickým endpoint titrem.
Specifická reakce protilátek je zobrazena v Tabulce 1 na konci tohoto dokumentu.

OMEZENÍ TESTU

V některých případech, séra pozitivní na anti-neuronální protilátky mohou být buď velmi slabá nebo negativní při úvodním screeningovém ředění díky prozónovému efektu. V takovýchto nejasných případech by měla být séra vyšetřena při vyšších ředěních, a v případě pozitivity by měl být stanoven titr protilátek.
Přítomnost dvou a více protilátek v séru reagujících se substrátem může způsobit interferenci při jejich detekci imunofluorescencí a anti-neuronální protilátky můžou být chybně detekovány nebo suprimovány. V takovýchto případech by měl být vzorek přetestován pomocí western blotu. Je doporučeno všechny pozitivní vzorky metodou western blotu.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

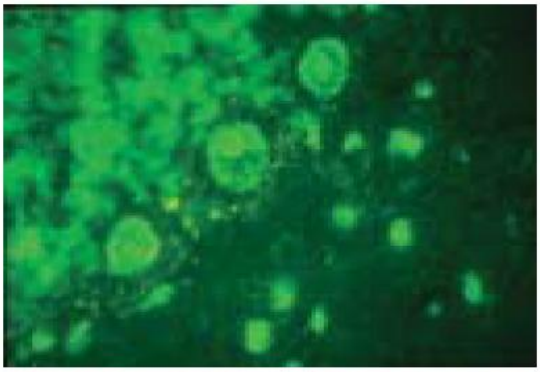
Existuje silná asociace mezi paraneoplastickým syndromem, anti-neuronálními protilátkami a daným typem nádoru. Přesto se u menší části pacientů s anti-neuronálními protilátkami a paraneoplastickým syndromem nemusí žádný nádor vyskytovat.
Někteří pacienti s paraneoplastickým syndromem nemusí mít detekovatelnou hladinu (pomocí IFA) anti-neuronálních protilátek. Většina případů s rozvinutým PCD v asociaci s Hodgkingovou chorobou, nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) a gastrointestinálním karcinomem nemají prokazatelné hladiny anti- Yo protilátek.
Existují také anti-Yo negativní protilátky, ale atypicky pozitivní proti cytoplasmě purkyňových buněk (atypické APCA). Tyto protilátky se mohou objevit v souvislosti s Hodgkinovou chorobou, adenokarcinomem plic, tlustého střeva a prostaty. [10]
U 5-6 % pacientů s karcinomem vaječníku se vyskytují cirkulující anti-Yo nebo anti-Ri protilátky i za nepřítomnosti jakéhokoliv paraneoplastického syndromu. [11]
Tabulka 2 na konci tohoto dokumentu ukazuje užitečnost testů na anti-neuronální protilátky.

Table 1: Immunofluorescent Reaction Pattern Identification

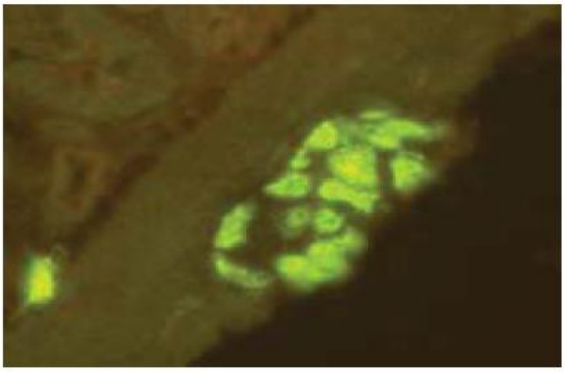
Antibody Specificity	Cerebellar Neurons Purkinje	Cerebellar Neurons Granular	Gut Myenteric Plexus	Liver
Hu (ANNA-1)	Nucleus + Nucleolus - Cytoplasm +	Nucleus + Nucleolus - Cytoplasm +	Nucleus + Nucleolus - Cytoplasm +	-
Ri (ANNA-2)	Nucleus - Nucleolus - Cytoplasm -	Nucleus + Nucleolus - Cytoplasm +	Nucleus - Nucleolus - Cytoplasm -	-
Yo (PCA-1)	Nucleus - Cytoplasm +	Nucleus - Cytoplasm -	Nucleus - Cytoplasm -	-

- = Negative; + = Positive

Fig. 1: Hu (ANNA-1) Antibody

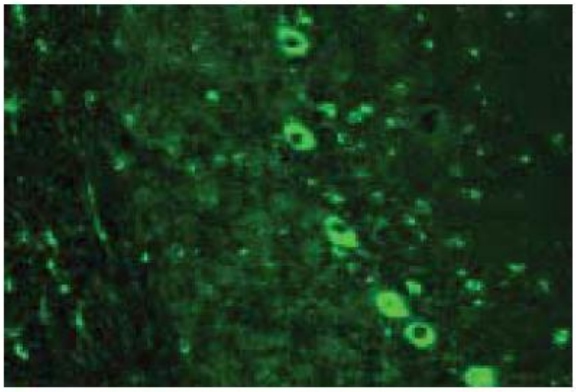


Indirect IF on primate cerebellum - staining of nuclei and cytoplasm of Purkinje and granular layer cells.



Indirect IF on rodent gut myenteric plexus

Fig. 2: Yo (PCA-1) Antibody



Indirect IF on primate cerebellum - staining of cytoplasm only.

Table 2: Clinical Significance of Paraneoplastic anti-Neuronal Antibodies[12-15]

Antibody Specificity	Paraneoplastic Neurological Syndrome	Most frequently associated tumors	Western Immunoblot criteria for detection
Anti-Hu (ANNA-1)	Encephalomyelitis, sensory neuropathology autonomic neuropathy	Small cell lung cancer, neuro-blastoma; rarely non small cell lung cancer, prostate cancer, seminoma	35-40 kD reactive bands on extracts of isolated CNS neurons or with recombinant proteins
Anti-Ri (ANNA-2)	Opsoclonus, ataxia, nystagmus dizziness dysarthria	Breast cancer, small cell lung cancer	55 and 80 kD bands on neuronal proteins or with recombinant proteins
Anti-Yo (PCA-1)	Subacute cerebellar syndrome, dysarthria and nystagmus	Ovarian cancer, breast cancer, other gyneco-logical cancers	62 kD band and mostly 24 kD band on purified Purkinje cell extracts or with recombinant proteins

LITERATURA

1. Posner, JB. Paraneoplastic syndromes. Neuro Clinics; 9:919-936, 1991.
2. Dalmau JO, Posner JB. Paraneoplastic syndromes. Arch Neurol; 56: 405-408, 1999.
3. Dropcho EJ. Principles of Paraneoplastic syndromes. Ann NY Acad Sci; 841:246-261, 1998.
4. Moll JWB, Henzen-Logmans SC, Splinter TAW et al. Diagnostic value of anti-neuronal antibodies for paraneoplastic disorders of the nervous system. J Neurol, Neurosurg Psych; 53:940-943, 1990.
5. Moll JWB, Vecht ChJ. Immune diagnosis of paraneoplastic neurological disease. Clin Neurol Neurosurg; 97:71-81, 1995.
6. Lennon VA. Paraneoplastic autoantibodies: The case for a descriptive generic nomenclature. Neurology; 44:2236-2240, 1994.
7. Lennon VA. The case for a descriptive generic nomenclature: Clarification of immunostaining criteria for PCA-1, ANNA-1 and ANNA-2 autoantibodies. Neurology; 44:2412-2415, 1994.
8. Dalmau J, Posner JB. Neurologic paraneoplastic antibodies (anti-Yo; anti-Hu; anti-Ri): The case for a nomenclature based on antibody and antigen specificity. Neurology; 44:2241-2246, 1994.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control, National Institute for Health. (HHS Pub. No {CDC} 93-8395) 1993.
10. Drophcho EJ.Autoimmune central nervous system paraneoplastic disorders:Mechanisms, diagnosis, and therapeutic options. Ann. Neurol; 37:S102-S113, 1995.
11. Drlicek M, Bianchi G, Boglium G, et. al. Antibodies of the anti-Yo and anti-Ri type in the absence of paraneoplastic neurological syndromes: a long term survey of ovarian cancer patients. J. Neurol; 244: 85-89, 1997.
12. Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK and Posner JB. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. A clinical study of 71 patients. Medicine; 71:59-72, 1992.
13. Greenlee JE, Brashear HR. Antibodies to cerebellar purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinoma. Ann Neurol; 14:609-613, 1983.
14. Altermatt HJ, Rodriguez M, Scheithauer BW and Lennon VA. Paraneoplastic anti-purkinje and type I anti-neuronal nuclear autoantibodies bind selectively to central, peripheral, and autonomic nervous system cells. Lab Invest; 65:412-420, 1991.
15. Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, et al. Anti-Ri: An antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. Ann Neurol; 29:241-251, 1991.