



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 



ImmuBlot™

Anti-Neuronal Antibody Western Blot Immunoassay

IVD

PRODUCT INSERT

Code: 1174

20 determinations

INTENDED USE

A Western Blot Immunoassay for the detection of anti-neuronal autoantibodies against Hu, Yo, Ri and other neuronal antigens in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

Autoimmune responses of the central nervous system (CNS), recognized as *paraneoplastic neurologic disorders* are manifestations of an immune response against tumors. These consist of a variety of neurological disorders like *paraneoplastic encephalomyelitis (PE)*, *sensory neuropathy (PSN)*, *cerebellar degeneration (PCD)*, *paraneoplastic opsoclonus myoclonus ataxia (POMA)* and *stiff person syndrome*¹⁻³. Clinical presentation includes sensory and memory loss, cerebellar, brainstem, motor or autonomic dysfunction (PE or PSN); involuntary saccadic eye movements, truncal and limbic myoclonus and ataxia (POMA). A reliable diagnosis of such conditions and the detection of the underlying tumor is difficult. In a significant number of cases in fact, the underlying tumor is not discovered until the patient presents with neurological symptoms^{4,5}. *Paraneoplastic disorders* are characterized by the presence of neuronal autoantibodies in patient serum. The detection of these autoantibodies is useful for the clinician as it represents the presence of an underlying tumor. Tumors that have been known to initiate paraneoplastic disorders are *small-cell lung cancer*, *neuroblastoma*, *breast*, *ovarian* and *testicular cancers*. The following autoantibodies are found in *paraneoplastic syndromes*⁶⁻⁸.

- a) anti-Hu, anti-neuronal nuclear antibody type I (ANNA-1) is associated with Small cell lung cancer resulting in PE
- b) anti-Ri, anti-neuronal nuclear antibody type II (ANNA-2) is associated with Neuroblastoma (Children) and Fallopian or Breast cancer (Adults) resulting in POMA
- c) anti-Yo, purkinje cell cytoplasmic antibody type I (PCA-1) is associated with certain gynecological cancers resulting in cerebellar degeneration.

Presence of one of these antibodies supports a clinical diagnosis of *paraneoplastic syndrome* and prompts a search for underlying neoplasm. These markers also help discriminate between true paraneoplastic disorders and other inflammatory disorders of the nervous system that mimic a paraneoplastic syndrome.

The Western Blot immunoassay provides a sensitive method for screening and confirmation of autoantibodies against various neuronal antigens present in the nucleus as well as the cytoplasm of granular and purkinje cells. Anti-Hu, anti-Yo and anti-Ri reactions can easily be observed at 35-40kD (Hu), 62kD (Yo) and 55kD (Ri). If the specimen yields no immunoreactivity on the blot strip, the result should be reported as negative.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

To perform the test, strips are incubated with diluted patient serum. Antibodies specifically bind to the neuronal nuclear antigens on the strip. After washing the strips, and two incubation steps using Conjugate A and Conjugate B, strips are washed and incubated with enzyme substrate. Anti-Hu, anti-Yo and anti-Ri antibody positive reactions appear as blue-violet bands at 35-40 kD (Hu), 62kD (Yo), and 55 kD (Ri).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Do not use if liquid reagents are turbid or a precipitate is present. Prior to starting the assay, reagents must be equilibrated to room temperature (~22°). Antigen strips can only be used once. Do not interchange components of different lots. Do not use reagents beyond expiration date indicated on labels.

Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by US FDA required tests. However, all human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious and good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials must be followed⁹.

WARNING - Sodium azide (NaN_3) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. NaN_3 is toxic if ingested. Report incidents immediately to laboratory director or poison control center.

Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents.

Materials provided

ImmuBlot™ anti-neuronal antibody Western Blot
Product Code: 1174

Kit contains sufficient reagents to perform 20 determinations.

1 x 20	Western Blot Strips
1 x 120 µl	*anti- Hu/Yo Positive Control (<i>purple vial cap</i>)
1 x 120 µl	*Negative Control (<i>yellow vial cap</i>).
1	Control Card
1 x 250 µl	*Conjugate A (<i>blue vial cap</i>)
1 x 250 µl	*Conjugate B (<i>white vial cap</i>)
1 x 60 ml	*Serum Diluent
1 x 25 ml	Enzyme Substrate (<i>amber bottle</i>)
1 vial	*Powdered Wash Buffer ; reconstitute to one liter with deionized or distilled water.
3	Assay trays
2	Report Forms

* Contains < 0.1% NaN_3

Material Required but not Provided

- Clean 1000 ml graduated cylinder
- Non-serrated forceps (Filter forceps)
- Rocker or rotating platform shaker
- Absorbent paper or paper towels
- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 10 to 1000 µl
- Disposable pipet tips
- Timer

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Procedural Notes

- Read Product Insert carefully before starting with the assay.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate to room temperature for ~30 minutes prior to starting the test procedure. Return all unused specimens and reagents to the refrigerator promptly after use.
- Proper washing technique is critical to the satisfactory performance of the assay.
- Manipulate test strips with clean forceps only. Do not touch with bare hands.
- Strips are individually numbered at the bottom of each strip. Assign specimen identification numbers to the respective strips on the Report Form.
- Complete all other relevant information on the Report Form prior to starting the assay.

Test Method

- Step 1** Using blunt forceps, place required number of **Strips** labeled side up into individual wells of the assay tray.
- Step 2** Pipet **1.0 ml** of Serum Diluent into each well.
- Step 3** Pipet **10 µl** of Positive and Negative Control and patient sample into appropriate wells to obtain a **1:101 dilution**. Incubate **60 minutes** (±5 min.) at room temperature on a rocker or rotating shaker.
- Step 4** Aspirate sample solution into waste container. Thoroughly wash strips with Wash Buffer by squirting approximately 2 ml of solution directly onto strips. Wash strips with gentle agitation for **5 minutes** and aspirate solution into waste container. **Repeat 2x.** *Caution: Complete washing of the strips between incubations is crucial to obtain valid results. Improper washing will result in high background staining.*
- Step 5** Pipet **1.0 ml** of Serum Diluent followed by **10 µl** of Conjugate into each well. Incubate **30 minutes** (±5 min) at room temperature on rocker or rotating shaker.
- Step 6** Repeat **Step 4**.
- Step 7** Pipet **1.0 ml** of Serum Diluent followed by **10 µl** of Conjugate B into each well. Incubate **30 minutes** (±5 min.) at room temperature on rocker or rotating shaker.
- Step 8** Repeat **Step 4**.
- Step 9** Pipet **1.0 ml** Substrate into each well and incubate with gentle shaking **10 minutes** (±5 min) at room temperature and reduced light.
- Step 10** Stop development with deionized water (2 x 1 minute).
- Step 11** Using blunt forceps, remove strips from assay tray and place them gently onto absorbent paper. Handle strips only at the ends and let them dry **15-20 minutes**.

Quality Control

Though the control cards are lot specific, negative and positive controls must be included in each test run to ensure proper performance of the assay.

Positive Control Reaction: A dense and diffused blue-violet band should appear at 35-40 kD, representing the anti-Hu reaction. A dense, sharp blue-violet band should appear at 62 kD representing the anti-Yo reaction. The positive control strip will usually develop the anti-Hu and anti-Yo bands along with the internal markers at 125 kD and a doublet at 70-77 kD. These are internal reference bands. In addition to these markers the positive control strip will also show a blue 116 kD marker (*refer to Figure 1*).

Negative Control Reaction: Typically, the negative control reaction will cause only the internal molecular weight markers at 125 kD and 70-77 kD to appear. Similarly, the negative control strip also shows a blue 116 kD marker (refer to Figure 2).

RESULTS

Reading and Interpretation Guidelines

The ImmuBlot™ anti-Neuronal antibody strips contain 125, 70, and 77 kD molecular weight markers. The 116 kD alignment marker serves as a guide to align the strips on the control card (refer to Figure 2).

- Step 1
- Hold test specimen strip between the positive and negative control strips on the provided, laminated Control Card and align test strip using the 116 kD molecular weight marker as the reference point (refer to Figure 2).
- Step 2
- Align test strip in the center of the control card and compare reactions of test strip with those of the controls on either side.

Figure 1

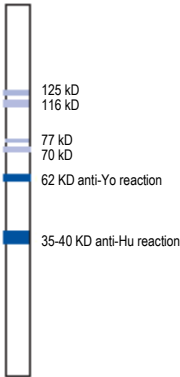
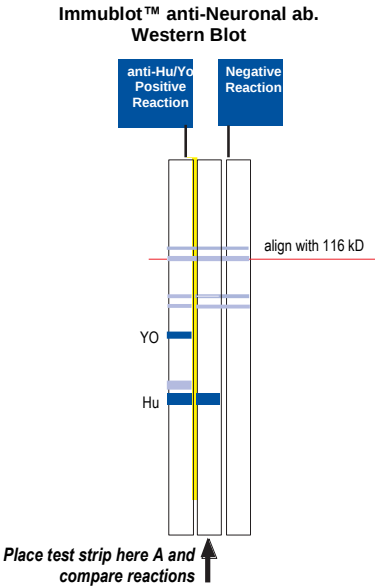


Figure 2



- Step 3
- If the band on the test strip is slightly below the anti-Yo control line and is approximately 55 kD it should be considered an anti-Ri reaction. A band on the test strip that aligns with the anti-Yo control line should be considered an anti-Yo reaction. A band on the test strip that aligns with the lower-most (darkest) anti-Hu control line should be considered an anti-Hu reaction. Positive reactions can also occur in varying intensities, from weak to strong. Weak reactions should be compared with baseline reaction intensities at the corresponding position on the negative control strip. Figure 2 provides an example of a properly aligned positive result.
- Step 4
- If there are no reaction bands visible and/or bands not corresponding to either anti-Hu (35-40 kD), anti-Yo (62 kD) or anti-Ri (55 kD) bands these should be considered anti-neuronal nuclear antigen negative specimens.

EXPECTED VALUES

There is a strong association among *paraneoplastic syndromes*, anti-neuronal antibody specificities and the associated tumor type. Paraneoplastic syndrome may occur months or years before a tumor is detected. The presence of neuronal autoantibodies helps in the detection of the underlying tumor. Antibodies against Hu are detected in about 20% of patients with lung cancer, while anti-Yo and anti- Ri ar present in about 2%-4% of cases. However, in a minority of patients with paraneoplastic syndrome with anti-neuronal antibodies, no tumor may be found. Certain patients with *paraneoplastic syndromes* may not have detectable antibody levels of anti-neuronal antibodies. 5-6% patients with Ovarian cancer have circulating anti-Ri antibodies in the absence of any paraneoplastic neurological syndrome¹⁰. The following table signifies the utility of antibody tests for anti- neuronal antibodies.

Clinical Significance of Paraneoplastic anti-Neuronal Antibodies¹¹⁻¹⁴

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
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 protein
Anti-Yo (PCA-1)	Subacute cerebellar syndrome, dysarthria and nystagmus	Ovarian cancer, breast cancer, other gynecological cancer	62 kD band and 34 kD band on purified Purkinje cell extracts

Frequency and Types of Cancer in Seropositive Patients with Paraneoplastic Antibodies¹⁷

Antibody	% Carcinomas Detected							Patients w/ Histologically Proven Cancer
	Lung SCLC	Lung NSCLC	Breast	Ovary	Fallopian Tube/ Uterus	Thymoma	Other	
Hu (ANNA-1)	66	4	0	0	0	2	8	80%
Yo (PCA-1)	0	0	13	63	13	0	1	91%
Ri (ANNA-2)	21	14	21	0	0	0	0	57%

SCLC = small cell lung carcinoma NSCLC = non-SCLC

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The ImmuBlot™ Anti-Neuronal Antibody Western Blot should be used as an aid in diagnosis. Positive results may be found in other autoimmune conditions and/or certain infectious diseases. Results should be evaluated and interpreted by the clinician or neurologist in light of patient clinical history and other laboratory findings. Some sera may react to the MW marker, the significance of which is not known. It is recommended that positive reactions at 35-40 kD (anti-Hu), 62 kD (anti-Yo), and 55 kD (anti-Ri) be supported by specific fluorescence pattern on the ImmuGlo™Ant-Neuronal Antibody IFA (*Product Code: 1111*).

TROUBLESHOOTING GUIDE

- **Strong band/s on Negative Control strip.** Likely cause: contaminated Negative Control vial, or cross contamination from well containing a positive serum.
- **Positive Control appears like Negative Control strip.** Likely cause: Negative Control vial was confused as Positive Control vial.
- **Strips are completely blank.** Likely cause: addition of Conjugate (A or B) or Substrate was omitted.
- **High background and poor contrast between bands and background.** Likely cause: wash step(s) may have been omitted or incorrectly performed, or incubations were overextended.


FOGLIETTO ILLUSTRATIVO

Codice: 1174

20 determinazioni

FINALITÀ D'USO

Saggio immunologico Western blot per la rilevazione di autoanticorpi antineuronali contro Hu, Yo, Ri e altri antigeni neuronali nel siero umano.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Le risposte autoimmuni del sistema nervoso centrale (SNC), riconosciute come *disturbi neurologici paraneoplastici*, sono manifestazioni della risposta immunitaria antitumorale. Queste consistono in una serie di disturbi neurologici quali *l'encefalomielite paraneoplastica (EMP)*, *la neuropatia sensoriale paraneoplastica (PSN)*, *la degenerazione cerebellare paraneoplastica (DCP)*, *l'atassia mioclonica-opsoclonica paraneoplastica (POMA)* e *la sindrome dell'uomo rigido (stiff man)*¹⁻³. La presentazione clinica include deficit sensoriale e perdita di memoria, disfunzione cerebellare, del tronco encefalico, motoria o autonoma (EMP o PSN); movimenti oculari saccadici involontari, miocloni e atassia del tronco e limbica (POMA). La diagnosi attendibile di tali condizioni e la rilevazione del tumore di base sono difficili. In un significativo numero di casi^{4,5} infatti, il tumore non viene scoperto sino alla comparsa dei sintomi neurologici nel paziente. I *disturbi paraneoplastici* sono caratterizzati dalla presenza di anticorpi neuronali nel siero del paziente. L'identificazione di tali anticorpi è utile al clinico, poiché ciò indica la presenza di un tumore di base. I tumori noti per causare disturbi paraneoplastici sono il *carcinoma polmonare a piccole cellule*, il *neuroblastoma* e il *cancro alla mammella, alle ovaie e ai testicoli*. Nel corso delle *sindromi paraneoplastiche* vengono rilevati i seguenti autoanticorpi⁶⁻⁸.

- a) L'anticorpo nucleare antineuronale Anti-Hu di tipo I (ANNA-1) è associato al carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC) che esita in EMP (encefalomielite paraneoplastica).
- b) L'anticorpo nucleare antineuronale anti-Ri di tipo II (ANNA-2) è associato al neuroblastoma (nei bambini) e al cancro alle tube di Falloppio e alla mammella (nell'adulto) che esitano in POMA (atassia mioclonica-opsoclonica paraneoplastica).
- c) Gli anticorpi anti-Yo, anti-citoplasma delle cellule di Purkinje di tipo I (PCA-1) sono associati a certe neoplasie ginecologiche che esitano in degenerazione cerebellare.

La presenza di uno di questi anticorpi supporta la diagnosi clinica di *sindrome paraneoplastica* e spinge alla ricerca della neoplasia di base. Tali marker sono utili anche a discriminare i disturbi paraneoplastici veri dagli altri disturbi infiammatori a carico del sistema nervoso che mimano una sindrome paraneoplastica.

Il saggio immunologico Western blot offre un metodo sensibile per lo screening e la conferma della presenza di autoanticorpi diretti contro vari antigeni neuronali presenti nel nucleo così come nel citoplasma delle cellule granulari e delle cellule di Purkinje. Le reazioni anti-Hu, anti-Yo e anti-Ri possono essere facilmente osservate a 35-40kD (Hu), 62kD (Yo) e 55kD (Ri). Se il campione non produce alcuna immunoreattività sulla striscia di blotting, il risultato deve essere riportato come negativo.

PRINCIPI DELLA METODICA

Per l'esecuzione del test, le strisce vengono incubate con il siero diluito del paziente. Gli anticorpi si legano specificamente agli antigeni nucleari neuronali sulla striscia. Dopo il lavaggio delle strisce e due fasi di incubazione con il coniugato A e il coniugato B, le strisce vengono ancora lavate e incubate con il substrato enzimatico. Le reazioni positive anticorpali anti-Hu, anti-Yo e anti-Ri appariranno come bande violette a 35-40 kD (Hu), 62kD (Yo) e 55kD (Ri).

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a una temperatura compresa fra 2-8°C. **Non congelare.** Non utilizzare se i reagenti liquidi appaiono torbidi o si rileva la presenza di precipitato. Prima di iniziare il saggio, è necessario portare i reagenti a temperatura ambiente (~ 22°). Le strisce di antigeni possono essere utilizzate solo una volta. Non impiegare componenti di lotti diversi. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sulle etichette.

Precauzioni

Tutti i componenti di derivazione umana impiegati sono stati testati per HbsAg, HCV HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi ai test prescritti dalla FDA statunitense. Tuttavia, tutti i derivati ematici umani e i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infettivi, pertanto per la conservazione, dispensazione e smaltimento di tali materiali è necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio⁹.

ATTENZIONE - L'azoturo di sodio (NaN_3) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame formando azoturi metallici altamente esplosivi. Durante lo smaltimento dei liquidi, sciacquare con abbondante acqua per prevenire l'accumulo di azoturo. L' NaN_3 è tossico se ingerito. Riferire immediatamente gli eventuali incidenti al responsabile del laboratorio o al centro antiveneni.

Attenersi alle buone pratiche di laboratorio per ridurre al minimo la contaminazione microbica e la contaminazione crociata dei reagenti.

Materiali forniti in dotazione

Saggio Western blot ImmunoBlot™ per la determinazione degli anticorpi antineuronali

Codice prodotto: 1174

Il kit contiene reagenti sufficienti per eseguire 20 determinazioni.

1 x 20	Strisce Western blot
1 x 120 µl	*Anti-Hu/Yo Controllo positivo (fiala con tappo viola)
1 x 120 µl	*Controllo negativo (fiala con tappo giallo)
1	Scheda di controllo
1 x 250 µl	*Coniugato A (fiala con tappo blu)
1 x 250 µl	*Coniugato B (fiala con tappo bianco)
1 x 60 ml	*Diluente per siero
1 x 25 ml	Substrato enzimatico (fiala ambrata)
1 vial	*Tampone di lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro con acqua deionizzata o distillata.
3	Vassoi per il saggio
2	Moduli per la refertazione

* Contiene < 0.1% NaN_3

Materiali necessari ma non forniti

- Cilindro graduato pulito da 1000 ml
- Pinze non dentellate (pinze da filtro)
- Oscillatore o agitatore rotante a piattaforma
- Carta assorbente o salviette di carta

IT

- Acqua deionizzata o distillata
- Spruzzetta per il tampone di lavaggio diluito
- Pipette in grado di versare da 10 a 1000 µl di liquido
- Puntali monouso per pipette
- Timer

RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

Per questa procedura utilizzare esclusivamente campioni di siero. I campioni fortemente emolizzati, lipemici o contaminati microbiologicamente possono interferire con le prestazioni del test e pertanto non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2-8 °C per non più di una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero devono essere congelati. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni.

PROCEDURA

Note procedurali

- Leggere attentamente il foglietto illustrativo prima di iniziare il saggio.
- Lasciare che i campioni di siero e i reagenti del test si portino a temperatura ambiente per circa 30 minuti prima di iniziare la procedura del test. Riporre tutti i campioni e i reagenti non utilizzati in frigorifero subito dopo l'uso.
- Per una prestazione soddisfacente del saggio è indispensabile impiegare la tecnica di lavaggio corretta.
- Manipolare le strisce del test esclusivamente con pinze pulite. Non toccarle a mani nude.
- Ogni striscia presenta una numerazione univoca apposta nella parte inferiore della striscia stessa. Assegnare i numeri identificativi del campione alle rispettive strisce sul modulo di refertazione.
- Completare tutte le altre informazioni rilevanti sul modulo di refertazione prima di iniziare il saggio.

Metodica del test

- Fase 1** Con un paio di pinze smusse, collocare il numero necessario di **strisce** in pozzetti individuali sul vassoio del saggio con la parte etichettata rivolta verso l'alto.
- Fase 2** Pipettare **1,0 ml** di diluente per siero in ogni pozzetto.
- Fase 3** Pipettare **10 µl** di controllo positivo e negativo e il campione del paziente negli appositi pozzetti per ottenere una **diluizione di 1:101**. Incubare per **60 minuti** (± 5 min.) a temperatura ambiente su un oscillatore o agitatore rotante.
- Fase 4** Aspirare la soluzione campione in un contenitore per rifiuti. Lavare accuratamente le strisce con il tampone di lavaggio, spruzzando circa 2 ml di soluzione direttamente sulle strisce. Lavare le strisce agitando delicatamente per **5 minuti** e aspirare la soluzione nel contenitore per rifiuti. **Ripetere la procedura 2 volte**. *Attenzione: per ottenere risultati validi è indispensabile lavare completamente le strisce tra un'incubazione e l'altra. Il lavaggio scorretto comporterà una forte colorazione di fondo.*
- Fase 5** Pipettare **1,0 ml** di diluente per siero seguito da **10 µl** di coniugato A in ciascun pozzetto. Incubare per **30 minuti** (t 5 min.) a temperatura ambiente su un oscillatore o agitatore rotante.
- Fase 6** Ripetere la **fase 4**.
- Fase 7** Pipettare **1,0 ml** di diluente per siero seguito da **10 µl** di coniugato B in ciascun pozzetto. Incubare per **30 minuti** (t 5 min.) a temperatura ambiente su un oscillatore o agitatore rotante.
- Fase 8** Ripetere la **fase 4**.
- Fase 9** Pipettare **1,0 ml** di substrato in ogni pozzetto e incubare con una leggera agitazione per **10 minuti** (t 5 min) a temperatura ambiente e luce bassa.
- Fase 10** Interrompere lo sviluppo con acqua deionizzata (2 volte x 1 minuto).
- Fase 11** Con un paio di pinze smusse, rimuovere le strisce dal vassoio del saggio e poggiarle delicatamente su carta assorbente. Maneggiare le strisce tenendole solamente alle estremità e lasciarle asciugare per **15-20 minuti**.

Controllo di qualità

Nonostante le schede di controllo siano specifiche per il lotto, i controlli negativi e positivi devono essere inclusi in ogni sessione analitica per assicurare la corretta prestazione del saggio.

Reazione di controllo positiva. Apparirà una banda densa e diffusa di colore blu-violetto a 35-40 kD, rappresentante la reazione anti-Hu. Deve apparire una banda nitida di colore blu-violetto a 62 kD, rappresentante la reazione anti-Yo. La striscia di controllo positiva di solito sviluppa le bande anti-Hu e anti-Yo unitamente ai marker interni a 125 kD e una doppietta a 70-77 kD. Queste sono le bande di riferimento interne. Oltre a queste marcature la striscia di controllo esibirà anche un marker blu a 116 kD (vedi Figura 1).

Reazione di controllo negativa. Tipicamente, la reazione di controllo negativa dà luogo solo alla comparsa di marker di peso molecolare interno a livello di 125 kD e 70-77 kD. Allo stesso modo, la striscia di controllo negativa esibirà anche un marker blu di 116 kD (vedi Figura 2).

RESULTSI

Linee guida per la lettura e l'interpretazione dei risultati

Le strisce di anticorpi antineuronali ImmuBlot™ contengono marker di peso molecolare 125, 70 e 77 kD. Il marker di allineamento di 116 kD funge da guida per l'allineamento delle strisce sulla scheda di controllo (vedi Figura 2).

Fase 1 Mantenere la striscia del campione per il test tra le strisce di controllo positivo e negativo sulla scheda di controllo laminata fornita in dotazione e allineare la striscia del test utilizzando il marker con peso molecolare 116 kD come punto di riferimento (vedi Figura 2).

Fase 2 Allineare la striscia del test al centro della scheda di controllo e confrontare le reazioni presenti sulla striscia del test con quelle dei controlli su entrambi i lati.

Figura 1

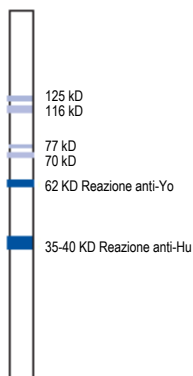
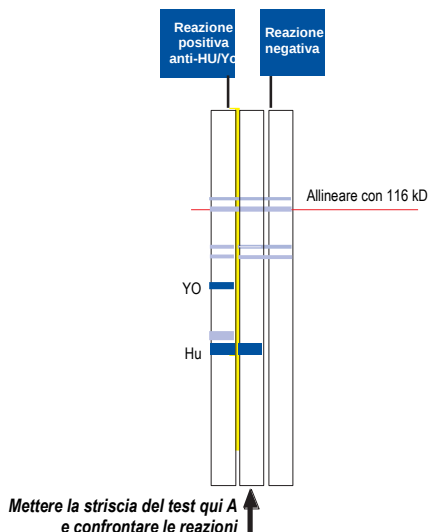


Figura 2

Saggio Western blot ImmuBlot per la determinazione di anticorpi antineuronali



Fase 3 Nel caso in cui la banda presente sulla striscia del test si trovi leggermente al di sotto della linea di controllo anti-Yo ed è all'incirca di 55 kD deve considerarsi come una reazione anti-Ri. La

presenza di una banda sulla striscia del test allineata alla linea di controllo anti-Yo deve essere considerata come una reazione anti-Yo. La presenza di una banda sulla striscia del test allineata alla linea di controllo anti-Ho che si trova nella posizione più inferiore (la linea più scura) deve essere considerata come una reazione anti-Hu. Le reazioni positive possono anche avere intensità variabili, da debole a forte. Le reazioni deboli devono essere messe a confronto con l'intensità delle reazioni basali nella posizione corrispondente sulla striscia di controllo negativo. La Figura 2 fornisce un esempio di un risultato positivo allineato correttamente.

Fase 4 Nel caso in cui non appaia alcuna banda di reazione visibile e/o le bande non corrispondono alle bande anti-Hu (35-40 kD), anti-Yo (62kD) né anti-Ri (55 kD), queste devono essere considerate come campioni negativi di antigeni nucleari antineuronali.

VALORI ATTESI

Esiste una forte correlazione fra sindromi paraneoplastiche, specificità degli anticorpi antineuronali e tipo di tumore associato. La sindrome paraneoplastica si può verificare mesi o anni prima della rilevazione del tumore. La presenza di autoanticorpi neuronali aiuta nell'identificazione del tumore di base. Gli anticorpi rivolti nei confronti di Hu vengono rilevati in circa il 20% dei pazienti affetti da carcinoma polmonare, mentre gli anticorpi anti-Yo e anti-Ri sono presenti in circa il 2%-4% dei casi. Tuttavia, in un basso numero di pazienti affetti da sindrome paraneoplastica con anticorpi antineuronali non viene osservato alcun tumore. Alcuni pazienti affetti da *sindromi paraneoplastiche* possono avere livelli anticorpali non rilevabili di anticorpi antineuronali. Il 5-6% delle pazienti con cancro alle ovaie esibisce anticorpi circolanti anti-Ri in assenza di qualsiasi sindrome neurologica paraneoplastica¹⁰. La tabella seguente illustra l'utilità dei test anticorpali per la ricerca degli anticorpi antineuronali.

Significato clinico degli anticorpi antineuronali paraneoplastic?¹¹⁻¹⁴

Specificità anticorpale	Sindrome neurologica paraneoplastica	Tumori più frequentemente associati	Criteri immunologici di Western blot per la rilevazione
Anti-Hu (ANNA-1)	Encefalomielite, neuropatologia sensoriale, neuropatia autonoma	Carcinoma a piccole cellule, neuroblastoma, raramente carcinoma non a piccole cellule, carcinoma prostatico, seminoma	Bande reattive di 35-40 kD su estratti di neuroni dei SNC isolati
Anti-Ri (ANNA-2)	Opsoclonia, atassia, nistagmo, capogiro, disartria	Cancro alla mammella, carcinoma polmonare a piccole cellule	Bande di 55 e 80 kD su proteine neuronali o con proteine ricombinanti
Anti-Yo (PCA-1)	Sindrome cerebellare subacuta, disartria e nistagmo	Cancro alle ovaie, cancro alla mammella, altre neoplasie ginecologiche	Banda di 62 kD e banda di 34 kD su estratti di cellule di Purkinje purificate

Frequenza e tipi di cancro in pazienti sieropositivi con anticorpi paraneoplastici¹⁷

Anticorpo	% di carcinomi rilevati							Pazienti con Cancro comprovato istologicamente
	Polmone		Mammella	Ovaie	Tube di Falloppio		Altro	
	SCLC	NSCLC						Tube/utero
Hu (ANNA-1)	66	4	0	0	0	2	8	80%
Yo (PCA-1)	0	0	13	63	13	0	1	91%
Ri (ANNA-2)	21	14	21	0	0	0	0	57%

SCLC = carcinoma polmonare a piccole cellule NSCLC = carcinoma polmonare non a piccole cellule

LIMITI DELLA PROCEDURA

Il saggio Western blot per la rilevazione degli anticorpi antineuronali ImmunoBlot™ deve essere impiegato come ausilio diagnostico. Risultati positivi possono essere rilevati in altre condizioni autoimmunitarie e/o

determinate malattie infettive. I risultati devono essere valutati e interpretati dal clinico o dal neurologo nell'ambito dell'anamnesi del paziente e altri risultati di laboratorio. Alcuni sieri possono reagire con marker di peso molecolare, con significato ancora ignoto. Si raccomanda che le reazioni positive a 35-40 kD (anti-Hu), 62kD (anti-Yo) e 55 kD (anti-Ri) siano supportate dallo schema di fluorescenza specifico all'IFA per la rilevazione di anticorpi antineuronali ImmuGlo™ (codice prodotto: 1111).

GUIDA ALLA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

- **Banda intesa (o bande intense) sulla striscia di controllo negativo.** Causa probabile: flacone di controllo negativo contaminato o contaminazione crociata da un pozzetto contenente un sieri positivo.
- **Il controllo positivo ha l'aspetto della striscia di controllo negativo.** Causa probabile: il flacone del controllo negativo è stato confuso con il flacone del controllo positivo.
- **Le strisce sono completamente bianche.** Causa probabile: è stata omessa l'aggiunta del coniugato (A o B) o del substrato.
- **Sfondo intenso e scarso contrasto tra le bande e lo sfondo.** Causa probabile: il passaggio o i passaggi di lavaggio potrebbero essere stati omessi o eseguiti in modo scorretto oppure le incubazioni si sono protratte eccessivamente.

ENCART DE PRODUIT

Code : 1174

20 mesures

APPLICATION

Un immunoessai Western-Blot pour la détection des auto-anticorps antineuronaux contre Hu, Yo, Ri et les autres antigènes neuronaux dans le sang humain.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les réponses auto-immunes du système nerveux central (SNC) reconnues comme étant des *troubles neurologiques paranéoplasiques* sont les manifestations d'une réponse immunitaire contre les tumeurs. Elles se composent d'une variété de désordres neurologiques comme *l'encéphalomyélite paranéoplasique (EMP)*, *la neuropathie sensorielle (NPS)*, *la dégénérescence cérébelleuse (DCP)*, *l'ataxie myoclonie-opsoclonie paranéoplasique (POMA)* et *le syndrome de la personne raide*¹⁻³. La présentation clinique comprend la perte sensorielle et de mémoire, les troubles cérébelleux, du tronc cérébral, moteur ou autonome (EMP ou NPS) ; des mouvements saccadés involontaires des yeux, myoclonie troncale et lombaire et l'ataxie (POMA). Un diagnostic fiable de telles conditions et la détection de la tumeur sous-jacente sont difficiles. Dans un nombre important de cas en fait, la tumeur sous-jacente n'est pas découverte jusqu'à ce que le patient présente des symptômes neurologiques^{4,5}. Les *troubles paranéoplasiques* sont caractérisés par la présence d'auto-anticorps neuronaux dans le sang des patients. La détection de ces auto-anticorps est utile pour le clinicien, car ils représentent la présence d'une tumeur sous-jacente. Les tumeurs qui sont connues pour provoquer des troubles paranéoplasiques sont *le cancer bronchique à petites cellules, les neuroblastomes, les cancers des seins, des ovaires et des testicules*. Les auto-anticorps suivants sont trouvés dans les *syndromes paranéoplasiques*⁶⁻⁸ :

- a) anti-Hu, anticorps nucléaire anti-neuronal de type I (ANNA-1) est associé au cancer bronchique à petites cellules résultant en EMP
- b) anti-Ri, anticorps nucléaire anti-neuronal de type II (ANNA-2) est associé aux neuroblastomes (enfants) et le cancer des seins et de la trompe de Fallope (adultes) résultant en POMA
- c) anti-Yo, anticorps cytoplasmique de cellule de Purkinje de type I (PCA-1) est associé à certains cancers gynécologiques entraînant de la dégénérescence cérébelleuse.

La présence d'un de ces anticorps supporte un diagnostic clinique d'un *syndrome paranéoplasique* et incite à chercher le néoplasme sous-jacent. Ces marqueurs aident aussi à distinguer entre les vrais troubles paranéoplasiques et les autres troubles inflammatoires du système nerveux qui imitent un syndrome paranéoplasique.

L'immunoessai Western-Blot fournit une méthode sensible de dépistage et de confirmation des auto-anticorps contre divers antigènes neuronaux présents dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme des cellules granulaires et de Purkinje. Les réactions anti-Hu, anti-Yo et anti-Ri peuvent facilement être observées à 35-40 kD (Hu), 62 kD (Yo) et 55 kD (Ri). Si l'échantillon ne donne aucune immunoréactivité sur le buvard, le résultat doit être rapporté comme étant négatif.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Pour effectuer un test, les bandes sont incubées avec le sang dilué du patient. Les anticorps spécifiquement liés aux antigènes nucléaires neuronaux sur le buvard. Après le lavage des bandes, et les deux étapes d'incubation utilisant le conjugué A et le conjugué B, les bandes sont lavées et incubées avec un substrat enzymatique. Les réactions positives des anticorps anti-Hu, anti-Yo et anti-Ri apparaissent comme des bandes bleu-violet à 35-40 kD (Hu), 62 kD (Yo) et 55 kD (Ri).

RÉACTIFS

Stockage et préparation

Stocker tous les réactifs entre 2 et 8 °C. **Ne pas congeler.** Ne pas utiliser si les réactifs liquides sont troubles ou si un précipité est présent. Avant de commencer l'essai, les réactifs doivent être équilibrés à la température ambiante (~22°). Les bandes d'antigènes ne peuvent être utilisées qu'une fois. Ne pas échanger les composants entre différents lots. Ne pas utiliser des réactifs au-delà de la date d'expiration indiquée sur les étiquettes.

Précautions

Toutes les composantes à dérivée humaine utilisées ont été testées pour HBsAg, HCV, HIV-1 et 2 et HTLV-I et tous les tests requis par la FDA sont revenus négatifs. Toutefois, tous les dérivés de sang humain et échantillons des patients doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux et de bonnes pratiques de laboratoire pour le stockage, la distribution et la mise au rebut de ces matériaux doivent être respectées⁹.

AVERTISSEMENT : L'azoture de sodium (NaN₃) peut réagir avec le plomb et le cuivre pour former des azotures métalliques hautement explosifs. Lors de la mise au rebut des liquides, rincez avec de grands volumes d'eau afin d'éviter l'accumulation d'azotures. NaN₃ est toxique si ingéré. Rapporter immédiatement les incidents au directeur de laboratoire ou au centre antipoison.

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire pour minimiser la contamination microbienne et croisée des réactifs.

Matériaux fournis

Western-Blot anticorps antineuronal d'ImmuBlot™
Code produit : 1174

Le kit contient suffisamment de réactifs pour effectuer 40 mesures.

- | | |
|-------------------|--|
| 1 x 20 | Bandes de buvard Western-Blot |
| 1 x 120 µl | *Contrôle positif anti- Hu/Yo (<i>fiole au capuchon violet</i>) |
| 1 x 120 µl | *Contrôle négatif (<i>fiole au capuchon jaune</i>). |
| 1 | Carte de contrôle |
| 1 x 250 µl | *Conjugué A (<i>fiole au capuchon bleu</i>) |
| 1 x 250 µl | *Conjugué B (<i>fiole au capuchon blanc</i>) |
| 1 x 60 ml | * Diluant du sang |
| 1 x 25 ml | Substrat enzymatique (<i>bouteille ambrée</i>) |
| 1 fiole | * Tampon de lavage en poudre ; à reconstituer à un litre avec de l'eau désionisée ou distillée. |
| 3 | Plateaux d'essais |
| 2 | Formulaires de rapport |

* Contient < 0,1 % NaN₃

Matériaux nécessaires, mais non fournis

- un cylindre gradué de 1000 ml propre
- des forceps non dentelés (forceps à filtre)
- un mélangeur ou secoueur à plateforme rotative
- du papier absorbant ou des serviettes en papier
- de l'eau déminéralisée ou distillée

- une pissette en plastique pour contenir le tampon de lavage dilué
- des pipettes capables de délivrer de 10 à 1000 µl
- des têtes de pipettes jetables
- un compte-minutes

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Seuls les spécimens de sang doivent être utilisés pour cette procédure. Les spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou contaminés par des microbes peuvent interférer avec la performance de ce test et ils ne doivent pas être utilisés. Stocker les spécimens entre 2 et 8 °C et pas plus d'une semaine. Pour un stockage plus long, le sang doit être congelé à -20 °C. Éviter les congélations et décongélations répétées des échantillons.

PROCÉDURE

Notes de procédure

- Lire l'encart du produit avec attention avant de commencer à faire l'essai.
- Laisser les échantillons de sang et les réactifs de test s'équilibrer à la température ambiante pendant ~30 minutes avant de commencer la procédure de test. Remettre rapidement tous les échantillons et les réactifs non utilisés dans le réfrigérateur après utilisation.
- Une bonne technique de lavage est essentielle à la performance satisfaisante de l'essai.
- Ne manipuler les bandes de test qu'avec des forceps propres. Ne pas toucher à mains nues.
- Les buvards sont numérotés individuellement en bas de chaque buvard. Assigner des numéros d'identification des échantillons aux bandes respectives sur le formulaire de rapport.
- Remplir toutes les informations pertinentes sur le formulaire de rapport avant de commencer l'essai.

Méthode de test

Etape 1 En utilisant des forceps émoussés, mettre le nombre de **bandes** nécessaires avec l'étiquette sur le dessus dans les puits individuels du plateau d'essai.

Etape 2 Verser **1,0 ml** à la pipette de diluant de sang dans chaque puits.

Etape 3 Verser **10 µl** de contrôles négatif et positif et d'échantillon du patient dans les puits appropriés afin d'obtenir une dilution de **1:101e**. Incuber pendant **60 minutes** (±5 min) à température ambiante sur un mélangeur ou un secoueur tournant.

Etape 4 Aspirer la solution d'échantillon dans un bac à déchets. Nettoyer proprement les bandes avec le tampon de lavage en faisant gicler environ 2 ml de solution directement sur les bandes. Laver les bandes avec une légère agitation pendant **5 minutes** et aspirer la solution dans un bac à déchets. **Répéter 2x.** *Précaution : Compléter le lavage des bandes entre les incubations est crucial à l'obtention des résultats valides. Un lavage incorrect entraînera une coloration élevée de l'arrière-plan.*

Etape 5 Verser **1,0 ml** à la pipette de diluant de sang suivi de **10 µl** de conjugué dans chaque puits. Incuber pendant **30 minutes** (±5 min) à température ambiante sur un mélangeur ou un secoueur tournant.

Etape 6 Répéter l'étape 4.

Etape 7 Verser **1,0 ml** à la pipette de diluant de sang suivi de **10 µl** de conjugué B dans chaque puits. Incuber pendant **30 minutes** (±5 min) à température ambiante sur un mélangeur ou un secoueur tournant.

Etape 8 Répéter l'étape 4.

Etape 9 Verser **1,0 ml** à la pipette de substrat dans chaque puits et incuber en remuant légèrement pendant **10 minutes** (±5 min) à température ambiante et à lumière réduite.

Etape 10 Arrêter le développement avec de l'eau désionisée (2 x 1 minute).

Etape 11 À l'aide de forceps émoussés, retirer les bandes du plateau à essai et les mettre délicatement sur du papier absorbant. Ne manipuler les bandes que par leurs extrémités et les laisser sécher entre **15 et 20 minutes**.

Contrôle de la qualité

Bien que les cartes de contrôle soient spécifiques au lot, les contrôles négatifs et positifs peuvent être inclus dans chaque test pour assurer la bonne performance de l'essai.

Réaction de contrôle positif : Une bande bleu-violet dense et diffusée doit apparaître à 35-40 kD, représentant la réaction anti-Hu. Une bande bleu-violet dense, intense doit apparaître à 62 kD représentant la réaction anti-Yo. Le buvard de contrôle positif développera généralement des bandes anti-Hu et anti-Yo le long des marqueurs internes à 125 kD et un doublet à 70-77 kD. Il s'agit de bandes de références internes. En plus de ces marqueurs, le buvard de contrôle positif présente aussi un marqueur bleu à 116 kD (*se reporter à la Figure 1*).

Réaction de contrôle négatif : D'une manière typique, la réaction de contrôle négatif ne provoquera que l'apparition de marqueurs de poids moléculaire internes à 125 kD et à 70-77 kD. D'une manière similaire, le buvard de contrôle négatif montre aussi un marqueur bleu à 116 kD (*se reporter à la Figure 2*).

RÉSULTATS

Conseils de lecture et d'interprétation

Les buvards d'anticorps anti-neuronaux d'ImmuBlot™ contiennent des marqueurs de poids moléculaire à 125, 70 et 77 kD. Le marqueur d'alignement à 116 kD sert de guide pour aligner les buvards sur la carte de contrôle (*se reporter à la Figure 2*).

- Etape 1** Tenir le buvard de l'échantillon testé entre les buvards de contrôle négatif et positif sur la carte de contrôle plastifiée fournie et aligner la bande de test en utilisant le marqueur de poids moléculaire à 116 kD comme point de référence (*se reporter à la Figure 2*).
- Etape 2** Aligner le buvard de test au centre de la carte de contrôle et comparer les réactions du buvard test avec celles des contrôles de chaque côté.

Figure 1

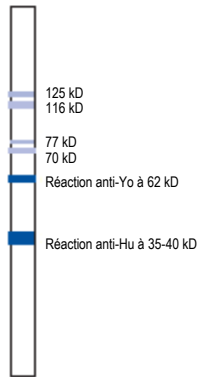
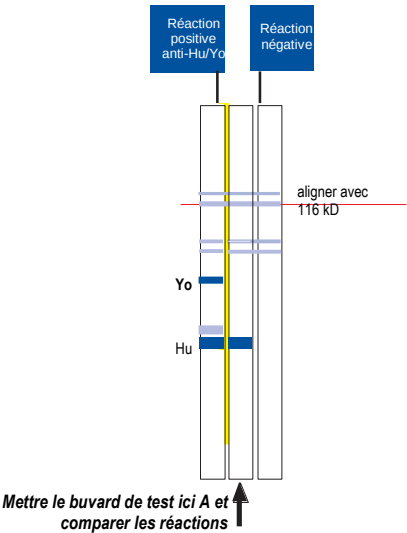


Figure 2

Western-Blot anticorps anti-neuronaux d'ImmuBlot™



- Etape 3** Si la bande sur le buvard de test est légèrement en dessous de la ligne de contrôle anti-Yo et qu'elle est approximativement de 55 kD, elle doit être considérée comme une réaction anti-Ri.

Une bande sur un buvard de test qui s'aligne avec la ligne de contrôle anti-Yo doit être considérée comme une réaction anti-Yo. Une bande sur un buvard de test qui s'aligne avec la ligne de contrôle anti-Hu la plus basse (la plus foncée) doit être considérée comme une réaction anti-Hu. Les réactions positives peuvent aussi se produire avec des intensités variées, allant d'une faible intensité à une forte intensité. Les réactions faibles doivent être comparées avec la ligne de base des intensités de réaction à la position correspondante sur le buvard de contrôle négatif. La Figure 2 fournit un exemple de résultat positif correctement aligné.

Etape 4 S'il n'existe aucune bande de réaction visible et/ou aucune bande correspondant à une réaction anti-Hu (de 35 à 40 kD), anti-Yo (62 kD) ou anti-Ri (55 kD), ces échantillons doivent être considérés comme un négatif aux anti-antigènes nucléaires neuronaux.

VALEURS ATTENDUES

Il existe une forte association parmi les *syndromes paranéoplasiques*, les spécificités anticorps anti-neuronaux et le type de tumeur associé. Le syndrome paranéoplasique peut se produire des mois ou des années avant que la tumeur ne soit détectée. La présence d'auto-anticorps neuronaux aide à la détection de la tumeur sous-jacente. Les anticorps anti-Hu sont détectés chez environ 20 % des patients souffrant d'un cancer du poumon, alors que l'anti-Yo et l'anti-Ri sont présents dans environ 2 à 4 % des cas. Toutefois, chez une minorité des patients atteints du syndrome paranéoplasique avec des anticorps anti-neuronaux, aucune tumeur ne peut être trouvée. Certains patients atteints de *syndromes paranéoplasiques* peuvent ne pas avoir des niveaux d'anticorps détectables d'anticorps anti-neuronaux. 5 ou 6 % des patients souffrant d'un cancer ovarien ont des anticorps anti-Ri circulant en l'absence de tout syndrome neurologique paranéoplasique¹⁰. Le tableau suivant indique l'utilité des tests d'anticorps pour les anticorps anti-neuronaux.

Importance clinique des anticorps anti-neuronaux paranéoplasique¹¹⁻¹⁴

Anticorps Spécificité	Syndrome neurologique paranéoplasique	Tumeurs les plus fréquemment associées	Critères de détection de l'immunoblot Western
Anti-Hu (ANNA-1)	Encéphalomyélite, neuropathie autonome neuropathologie sensorielle.	Cancer bronchique à petites cellules, neuroblastomes ; rarement cancer bronchique non à petites cellules, cancer de la prostate, séminomes	Bandes réactives de 35-40 kD sur les extraits de neurones SNC isolés
Anti-Ri (ANNA-2)	Opsoclonie, ataxie, dysarthrie vertige nystagmus.	Cancer des seins, cancer bronchique à petites cellules	Les bandes à 55 et 80 kD sur les protéines neuronales ou avec une protéine recombinante
Anti-Yo (PCA-1)	Syndrome cérébelleux subaigu, dysarthrie et nystagmus	Cancer ovarien, cancer des seins, autres cancers gynécologiques	Bande de 62 kD et bande de 34 kD sur les extraits de cellules de Purkinje purifiées

Fréquence et types de cancers chez les patients séropositifs avec des anticorps paranéoplasiques¹⁷

Anticorps	% de carcinomes détectés							Patients avec Cancer prouvé par histologie
	Poumon		Seins	Trompe de Fallope		Autre		
	SCLC	NSCLC		Ovaire	Tube/ Utérus		Thymome	
Hu (ANNA-1)	66	4	0	0	0	2	8	80 %
Yo (PCA-1)	0	0	13	63	13	0	1	91 %
Ri (ANNA-2)	21	14	21	0	0	0	0	57 %

SCLC = carcinome bronchitique à petites cellules NSCLC = non SCLC

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Le Western-Blot anticorps antineuronal d'ImmuBlot™ doit être utilisé comme une aide au diagnostic. Les résultats positifs peuvent être trouvés dans d'autres conditions auto-immunes et/ou certaines maladies infectieuses. Les résultats doivent être évalués et interprétés par le clinicien ou le neurologue en fonction de l'historique clinique du patient et des autres résultats de laboratoire. Certains échantillons sanguins peuvent réagir avec le marqueur MW dont l'importance n'est pas connue. Il est recommandé que les réactions positives à 35-40 kD (anti-Hu), 62 kD (anti-Yo) et 55 kD (anti-Ri) soient supportées par un modèle de fluorescence spécifique sur l'IFA anticorps anti-neuronaux d'ImmuGlo™ (Code de produit : 1111).

GUIDE DE DÉPANNAGE

- **Forte(s) bande(s) sur un buvard de contrôle négatif.** Raison probable : fiole de contrôle négatif contaminée, ou contamination croisée du puits contenant un échantillon sanguin positif.
- **Le contrôle positif ressemble à un buvard de contrôle négatif.** Raison probable : La fiole de contrôle négatif a été confondue avec la fiole de contrôle positif.
- **Les bandes sont entièrement vierges.** Raison probable : l'addition de conjugué (A ou B) ou de substrat a été omise.
- **Arrière-plan intense et médiocre contraste entre les bandes et l'arrière-plan.** Raison probable : la ou les étapes de lavage ont été oubliées ou effectuées de manière incorrecte ou les incubations ont été trop prolongées.

BULA

Código: 1174

20 determinações

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Um imunoensaio de Western Blot para a deteção de anticorpos antineuronais contra Hu, Yo, Ri e outros antígenos neuronais no soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

As respostas autoimunes do sistema nervoso central (SNC), reconhecidas como *distúrbios neurológicos paraneoplásicos*, são manifestações de uma resposta imunológica contra tumores. Estas consistem numa variedade de distúrbios neurológicos como *encefalomielite paraneoplásica (EP)*, *neuropatia sensorial (sensory neuropathy, PSN)*, *degeneração cerebelar (DCP)*, *opsoclonia-mioclonia-ataxia paraneoplásica (paraneoplastic opsoclonus myoclonus ataxia, POMA)* e *síndrome da pessoa rígida*¹⁻³. A apresentação clínica inclui perda sensorial e de memória, disfunção cerebelar, motora, autónoma ou do tronco cerebral (EP ou PSN); movimentos oculares sacádicos involuntários, ataxia e mioclonia do tronco e dos membros (POMA). É difícil obter um diagnóstico fiável destas doenças e detetar o tumor subjacente. De facto, num número significativo de casos, o tumor subjacente não é descoberto até o paciente apresentar sintomas neurológicos^{4,5}. Os *distúrbios paraneoplásicos* são caracterizados pela presença de autoanticorpos neuronais no soro do paciente. A deteção destes autoanticorpos é útil para o médico, visto que representa a presença de um tumor subjacente. Os tumores conhecidos por darem início a distúrbios paraneoplásicos são cancro do pulmão de células pequenas, neuroblastoma e cancro da mama, dos ovários e dos testículos. Os seguintes autoanticorpos são encontrados nas *síndromes paraneoplásicas*⁶⁻⁸:

- d) anti-Hu, um anticorpo antineuronal nuclear de tipo I (anti-neuronal nuclear antibody, ANNA-1), está associado ao cancro do pulmão de células pequenas que resulta em EP
- e) anti-Ri, um anticorpo antineuronal nuclear de tipo II (ANNA-2), está associado ao neuroblastoma (crianças) e cancro da mama ou das trompas de Falópio (adultos) que resultam em POMA
- f) anti-Yo, um anticorpo citoplasmático de células de Purkinje de tipo I (purkinje cell cytoplasmic antibody type I, PCA-1), está associado a determinados cancros ginecológicos que resultam em degeneração cerebelar.

A presença de um destes anticorpos suporta um diagnóstico clínico de síndrome paraneoplásica e suscita uma investigação de neoplasia subjacente. Estes marcadores também ajudam a fazer a distinção entre verdadeiros distúrbios paraneoplásicos e outros distúrbios inflamatórios do sistema nervoso que imitam uma síndrome para neoplásica.

O imunoensaio de Western Blot fornece um método sensível para a triagem e confirmação de autoanticorpos contra vários antígenos neuronais presentes no núcleo, bem como no citoplasma de células granulosas e de Purkinje. As reações anti-Hu, anti-Yo e anti-Ri podem ser facilmente observadas a 35-40 kD (Hu), 62 kD (Yo) e 55 kD (Ri). Se o espécime não produzir imunorreatividade na tira de *blot*, o resultado deve ser comunicado como negativo.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Para realizar o teste, as tiras são incubadas com soro diluído do paciente. Os anticorpos ligam-se especificamente aos antígenos neuronais nucleares na tira. Após lavar as tiras e depois de duas etapas de incubação utilizando conjugado A e conjugado B, as tiras são lavadas e incubadas com substrato

enzimático. Reações positivas dos anticorpos anti-Hu, anti-Yo e anti-Ri surgem como bandas azul-violeta a 35-40 kD (Hu), 62 kD (Yo) e 55 kD (Ri).

REAGENTES

Armazenamento e preparação

Armazene todos os reagentes a 2-8 °C. **Não os congele.** Não utilize se os reagentes líquidos estiverem turvos ou se um precipitado estiver presente. Antes de iniciar o ensaio, os reagentes devem ser equilibrados à temperatura ambiente (~22°). As tiras de antígeno apenas podem ser utilizadas uma vez. Não troque os componentes de lotes diferentes. Não utilize os reagentes após o seu prazo de validade, que está indicado no rótulo.

Precauções

Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados quanto a HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e apresentaram resultados negativos segundo os testes exigidos pela FDA dos EUA. Contudo, todos os derivados do sangue humano e espécimes dos pacientes devem ser considerados potencialmente infecciosos, pelo que devem ser seguidas boas práticas laboratoriais em termos de armazenamento, distribuição e eliminação destes materiais⁹.

AVISO - A azida sódica (NaN_3) pode reagir com canalizações de chumbo e cobre e formar azidas metálicas altamente explosivas. Ao eliminar os líquidos, utilize grandes volumes de água para evitar a acumulação de azidas na canalização. NaN_3 é tóxico se for ingerido. Comunique qualquer incidente imediatamente ao diretor do laboratório ou ao centro de informação antivenenos.

Siga boas práticas laboratoriais para minimizar a contaminação cruzada e microbiana dos reagentes.

Materiais fornecidos

ImmuBlot™ - Imunoensaio de Western Blot para anticorpos antineuronais
Código do produto: 1174

O kit contém reagentes suficientes para realizar 20 determinações.

1 x 20	Fitas de Western Blot
1 x 120 µl	*Controlo positivo anti-Hu/Yo (<i>frasco de tampa roxa</i>)
1 x 120 µl	*Controlo negativo (<i>frasco com tampa amarela</i>).
1	Cartão de controlo
1 x 250 µl	*Conjugado A (<i>frasco com tampa azul</i>)
1 x 250 µl	*Conjugado B (<i>frasco com tampa branca</i>)
1 x 60 ml	*Diluyente sérico
1 x 25 ml	Substrato enzimático (<i>frasco âmbar</i>)
1 frasco	*Tampão de lavagem em pó ; reconstituir para um litro com água destilada ou desionizada.
3	Bandejas de ensaio
2	Formulários de comunicação

* Contém < 0,1% de NaN_3

Material necessário mas não fornecido

Proveta limpa de 1000 ml
Pinça não serrilhada (pinça para filtros)

Oscilador ou agitador com plataforma rotativa
Papel absorvente ou toalhas de papel
Água destilada ou desionizada
Garrafa de aperto para conter o tampão de lavagem diluído
Pipetas com capacidade de fornecimento de 10 a 1000 µl
Pontas descartáveis para as pipetas
Temporizador

RECOLHA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Apenas devem ser utilizados espécimes séricos neste procedimento. Espécimes hemolisados macroscopicamente, lipémicos ou contaminados microbiologicamente podem interferir com a realização deste teste, pelo que não devem ser utilizados. Armazene os espécimes a 2-8 °C até, no máximo, uma semana. Em caso de um armazenamento mais prolongado, o soro deve ser congelado a -20 °C. Evite o congelamento e descongelamento repetidos das amostras.

PROCEDIMENTO

Notas relativas ao procedimento

Leia a bula do produto atentamente antes de iniciar o ensaio.
Equilibre os espécimes séricos e os reagentes de teste à temperatura ambiente por ~30 minutos antes de iniciar o procedimento de teste. Volte a colocar todos os espécimes e reagentes não utilizados no refrigerador imediatamente após a utilização.
Uma técnica de lavagem adequada é essencial para a realização satisfatória do ensaio.
Manuseie as tiras de teste apenas com uma pinça limpa. Não toque nas tiras com as mãos.
As tiras estão numeradas individualmente na sua parte inferior. Atribua os números de identificação do espécime às respetivas tiras no formulário de comunicação.
Preencha todas as restantes informações relevantes no formulário de comunicação antes de iniciar o ensaio.

Método de teste

Etapla 1 Utilizando uma pinça não serrilhada, coloque o número necessário de **tiras** com o rótulo virado para cima nas cavidades individuais da bandeja de ensaio.

Etapla 2 Pipete **1,0 ml** de diluente sérico em cada cavidade.

Etapla 3 Pipete **10 µl** de controlo positivo e negativo e da amostra do paciente nas devidas cavidades para obter uma **diluição igual a 1:101**. Incube durante **60 minutos** (±5 min.) à temperatura ambiente num oscilador ou agitador rotativo.

Etapla 4 Aspire a solução de amostra para um recipiente de resíduos. Lave as tiras minuciosamente com o tampão de lavagem esguichando aproximadamente 2 ml da solução diretamente para as tiras. Lave as tiras com uma agitação suave durante **5 minutos** e aspire a solução para o recipiente de resíduos. **Repita 2x**. *Cuidado: uma lavagem completa das tiras entre incubações é essencial para obter resultados válidos. Uma lavagem inadequada irá resultar numa elevada coloração de fundo.*

Etapla 5 Pipete **1,0 ml** de diluente sérico seguido por **10 µl** de conjugado para cada cavidade. Incube durante **30 minutos** (±5 min.) à temperatura ambiente num oscilador ou agitador rotativo.

Etapla 6 Repita a **etapa 4**.

Etapla 7 Pipete **1,0 ml** de diluente sérico seguido por **10 µl** de conjugado B para cada cavidade. Incube durante **30 minutos** (±5 min.) à temperatura ambiente num oscilador ou agitador rotativo.

Etapla 8 Repita a **etapa 4**.

Etapla 9 Pipete **1,0 ml** de substrato para cada cavidade e incube com agitação suave durante **10 minutos** (±5 min.) à temperatura ambiente com iluminação reduzida.

Etapla 10 Interrompa o desenvolvimento com água desionizada (2 x 1 minuto).

Etapla 11 Utilizando uma pinça não serrilhada, remova as tiras da bandeja de ensaio e coloque-as delicadamente em papel absorvente. Manuseie as tiras apenas nas extremidades e deixe-as secar durante **15-20 minutos**.

Controlo de qualidade

Embora os cartões de controlo sejam específicos de cada lote, os controlos negativos e positivos devem ser incluídos em cada série de teste para assegurar a realização adequada do ensaio.

Reação do controlo positivo: deve surgir uma banda azul-violeta densa e difusa a 35-40 kD, que representa a reação anti-Hu. Deve surgir uma banda azul-violeta densa e acentuada a 62 kD, que representa a reação anti-Yo. A tira de controlo positivo desenvolve geralmente as bandas anti-Hu e anti-Yo juntamente com os marcadores internos a 125 kD e um duplicado a 70-77 kD. Estas são bandas de referência interna. Além destes marcadores, a tira de controlo positivo também mostra um marcador azul de 116 kD (consulte a Figura 1).

Reação do controlo negativo: geralmente, a reação do controlo negativo apenas faz com que surjam os marcadores de peso molecular interno a 125 kD e 70-77 kD. Da mesma forma, a tira de controlo negativo também mostra um marcador azul de 116 kD (consulte a Figura 2).

RESULTADOS

Diretrizes de leitura e interpretação

As tiras de anticorpos antineuronais do ensaio ImmuBlot™ contêm marcadores de peso molecular de 125, 70 e 77 kD. O marcador de alinhamento de 116 kD serve como guia para alinhar as tiras no cartão de controlo (consulte a Figura 2).

- Etapa 1** Segure a tira do espécime de teste entre as tiras de controlo positivo e negativo no cartão de controlo laminado fornecido e alinhe a tira de teste utilizando um marcador de peso molecular de 116 kD como ponto de referência (consulte a Figura 2).
- Etapa 2** Alinhe a tira de teste no centro do cartão de controlo e compare as reações da tira de teste às reações dos controlos nos dois lados.

Figura 1

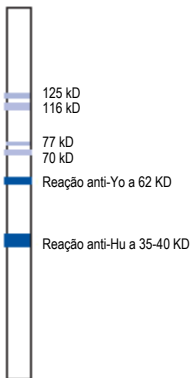
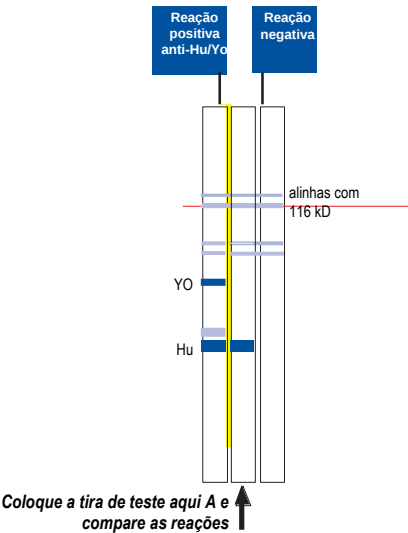


Figura 2

ImmuBlot™ - ensaio de Western Blot para anticorpos antineuronais



- Etapa 3** Se a banda da tira de teste estiver ligeiramente abaixo da linha de controlo anti-Yo e tiver aproximadamente 55 kD, deve considerar-se uma reação anti-Ri. Uma banda da tira de teste

que esteja alinhada com a linha de controlo anti-Yo deve ser considerada uma reação anti-Yo. Uma banda da tira de teste que esteja alinhada com a linha de controlo anti-Hu mais baixa (mais escura) deve ser considerada uma reação anti-Hu. Também podem ocorrer reações positivas em intensidades variadas, de fraca e forte. As reações fracas devem ser comparadas às intensidades da reação de referência na posição correspondente da tira de controlo negativo. A Figura 2 fornece um exemplo de um resultado positivo devidamente alinhado.

Etapa 4 Se não houver bandas de reação visíveis e/ou bandas que não correspondam às bandas anti-Hu (35-40 kD), anti-Yo (62 kD) ou anti-Ri (55 kD), estas devem ser consideradas espécimes negativos para antígeno antineuronal nuclear.

VALORES PREVISTOS

Existe uma forte associação entre as *síndromes paraneoplásicas*, as especificidades dos anticorpos antineuronais e o tipo de tumor associado. Uma síndrome paraneoplásica pode ocorrer meses ou anos antes de ser detetado um tumor. A presença de autoanticorpos neuronais ajuda a detetar o tumor subjacente. São detetados anticorpos contra Hu em cerca de 20% dos pacientes com cancro do pulmão, ao passo que anticorpos anti-Yo e anti-Ri estão presentes em cerca de 2%-4% dos casos. Contudo, numa minoria dos pacientes com síndrome paraneoplásica com anticorpos antineuronais, pode não ser encontrado qualquer tumor. Alguns pacientes com *síndromes paraneoplásicas* podem não ter níveis detetáveis de anticorpos antineuronais. 5-6% dos pacientes com cancro dos ovários têm anticorpos anti-Ri circulantes na ausência de qualquer síndrome neurológica paraneoplásica¹⁰. A tabela seguinte mostra a utilidade dos testes de anticorpos para anticorpos antineuronais.

Importância clínica dos anticorpos antineuronais paraneoplásicos¹¹⁻¹⁴

Especificidade do anticorpo	Síndrome neurológica paraneoplásica	Tumores mais frequentemente associados	Critérios de deteção do ensaio Western Immunoblot
Anti-Hu (ANNA-1)	Encefalomielite, neuropatologia sensorial, neuropatia autónoma.	Cancro do pulmão de células pequenas, neuroblastoma; raramente cancro do pulmão de células não pequenas, cancro da próstata, seminoma	Bandas reativas de 35-40 kD em extratos de neurónios isolados do SNC
Anti-Ri (ANNA-2)	Opsoclonia, ataxia, nistagmo, tinturas, disartria.	Cancro da mama, cancro do pulmão de células pequenas	Bandas de 55 e 80 kD em proteínas neuronais ou com proteína recombinante
Anti-Yo (PCA-1)	Síndrome cerebelar subaguda, disartria e nistagmo	Cancro dos ovários, cancro da mama, outros cancros ginecológicos	Banda de 62 kD e banda de 34 kD em extratos de células de Purkinje purificados

Frequência e tipos de cancro em pacientes seropositivos com anticorpos paraneoplásicos¹⁷

Anticorpo	% de carcinomas detetados							Pacientes c/ Cancro comprovado histologicamente
	Pulmão		Mama	Ovários	Trompas de Falópio/ Útero	Timoma	Outro	
	SCLC	NSCLC						
Hu (ANNA-1)	66	4	0	0	0	2	8	80%
Yo (PCA-1)	0	0	13	63	13	0	1	91%
Ri (ANNA-2)	21	14	21	0	0	0	0	57%

SCLC = Cancro do pulmão de células pequenas (small cell lung cancer) NSCLC = Cancro do pulmão de não-pequenas células (non-small cell lung cancer)

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O ensaio de Western Blot ImmunoBlot™ para anticorpos antineuronais deve ser utilizado como auxiliar de diagnóstico. Podem ser encontrados resultados positivos noutras doenças autoimunes e/ou determinadas doenças infecciosas. Os resultados devem ser avaliados e interpretados pelo médico ou neurologista tendo em conta o histórico clínico do paciente e outras descobertas laboratoriais. Alguns soros podem reagir ao marcador de peso molecular (molecular weight, MW), sendo que a importância deste facto não é conhecida. Recomenda-se que as reações positivas a 35-40 kD (anti-Hu), 62 kD (anti-Yo) e 55 kD (anti-Ri) sejam suportadas por um padrão de fluorescência específico no ensaio de imunofluorescência (Immunofluorescence Assay, IFA) ImmunoGlo™ para anticorpos antineuronais (*código do produto: 1111*).

GUIA DE RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Banda(s) forte(s) na tira de controlo negativo. Causa provável: frasco de controlo negativo contaminado ou contaminação cruzada da cavidade com o soro positivo.

O controlo positivo assemelha-se à tira de controlo negativo. Causa provável: o frasco do controlo negativo foi confundido com o frasco do controlo positivo.

As tiras estão totalmente em branco. Causa provável: a adição do conjugado (A ou B) ou substrato foi omitida.

Elevada coloração de fundo e contraste fraco entre as bandas e o fundo. Causa provável: a(s) etapa(s) de lavagem pode(m) ter sido omitida(s) ou realizada(s) incorretamente ou as incubações foram excessivamente prolongadas.



ImmuBlot™

Anticuerpo Anti-Neuronal Inmunoensayo Western Blot

IVD

PROSPECTO DEL PRODUCTO

Código: 1174

20 determinaciones

USO PREVISTO

Un Inmunoensayo Western Blot para la detección de anticuerpos anti-neuronales contra Hu, Yu, Ri y otros antígenos neuronales en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las respuestas autoinmunes del sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés), conocidas como *trastornos neurológicos paraneoplásicos* son manifestaciones de una respuesta inmune contra los tumores. Estas consisten en una variedad de trastornos neurológicos como la *encefalomielitis paraneoplásica (PE, por sus siglas en inglés)*, *neuropatía sensorial (PSN, por sus siglas en inglés)*, *degeneración del cerebelo (PCD, por sus siglas en inglés)*, *opsoclon mioclono atáxico paraneoplásico (POMA, por sus siglas en inglés)* y *el síndrome de la persona rígida*¹⁻³. La presentación clínica incluye la pérdida sensorial y la memoria, cerebelosa, tronco encefálico, disfunción autonómica o motora (PE o PSN); movimientos oculares sacádicos involuntarios, mioclonias límbica y troncal y ataxia (POMA). Un diagnóstico fiable de tales condiciones y la detección del tumor subyacente es difícil. En un número significativo de casos, de hecho, el tumor subyacente no se descubre hasta que el paciente se presenta con síntomas neurológicos^{4,5}. Los *trastornos paraneoplásicos* se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos neuronales en el suero del paciente. La detección de estos autoanticuerpos es útil para el profesional clínico, ya que representa la presencia de un tumor subyacente. Los tumores que se han conocido para iniciar los trastornos paraneoplásicos son el *cáncer de pulmón de células pequeñas*, *neuroblastoma*, *cáncer de mama*, y *cánceres de ovario y testiculares*. Los siguientes autoanticuerpos se encuentran en *síndromes paraneoplásicos*⁶⁻⁸:

- g) El anti-Hu, anticuerpo nuclear anti-neuronal tipo I (ANNA-1, por sus siglas en inglés) se asocia con el cáncer de pulmón de células pequeñas que resulta en PE.
- h) El anti-Ri, anticuerpo nuclear anti-neuronal tipo II (ANNA-2, por sus siglas en inglés) se asocia con el Neuroblastoma (Niños) y el cáncer de Mama y de las Trompas de Falopio (Adultos) que resulta en POMA.
- i) El anti-Yo, anticuerpo citoplásmico de células de Purkinje tipo I (PCA-1, por sus siglas en inglés) se asocia con ciertos cánceres ginecológicos resultantes en degeneración cerebelosa.

La presencia de uno de estos anticuerpos sustenta un diagnóstico clínico de *síndrome paraneoplásico* y solicita una búsqueda de neoplasma subyacente. Estos marcadores también ayudan a discriminar entre los verdaderos trastornos paraneoplásicos y otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso que imitan un síndrome paraneoplásico.

El inmunoensayo Western Blot proporciona un método sensible para la detección y confirmación de autoanticuerpos contra diversos antígenos neuronales presentes en el núcleo, así como en el citoplasma de células granulosas y de Purkinje. Las reacciones anti-Hu, anti-Yo y anti-Ri pueden ser fácilmente observadas en 35-40kD (Hu), 62kD (Yo) y 55kD (Ri). Si la muestra no da inmunoreactividad en la tira absorbente, el resultado debe ser reportado como negativo.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Para realizar la prueba, las tiras se incuban con suero diluido del paciente. Los anticuerpos se unen específicamente a los antígenos nucleares neuronales en la tira. Después de lavar las tiras, y dos pasos de incubación utilizando Conjugado A y Conjugado B, las tiras se lavan y se incuban con sustrato de la enzima. Las reacciones positivas de los anticuerpos anti-Hu, anti-Yo y anti-Ri aparecen como bandas azul-violeta en 35-40 kD (Hu), 62 kD (Yo), y 55 kD (Ri).

REACTIVOS

Almacenamiento y Preparación

Almacenar todos los reactivos a 2-8°C. **No congelar.** No utilizarlos si los reactivos líquidos son turbios o está presente un precipitado. Antes de iniciar el ensayo, los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente (~22°). Las tiras de antígeno sólo se pueden utilizar una vez. No intercambiar componentes de diferentes lotes. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas.

Precauciones

Todos los componentes derivados de humanos utilizados han sido probados para HBsAg, VHC, VIH-1 y 2 y HTLV-I y se encontraron negativos por las pruebas requeridas por la FDA de los EE.UU. Sin embargo, todos los derivados de sangre humana y las muestras de pacientes deben considerarse potencialmente infecciosas y deben seguirse las buenas prácticas de laboratorio en el almacenamiento, suministro y eliminación de estos materiales⁹.

ADVERTENCIA - La azida sódica (NaN_3) puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar compuestos altamente explosivos. Tras la eliminación de los líquidos, lavar con gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azida. La NaN_3 es tóxica si se ingiere. Informar inmediatamente los incidentes al director del laboratorio o al centro de toxicología.

Seguir las buenas prácticas de laboratorio para minimizar la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos.

Materiales proporcionados

Anticuerpo Anti-Neuronal Western Blot ImmuBlot™

Código del Producto: 1174

El kit contiene reactivos suficientes para realizar 20 determinaciones.

1 x 20	Tiras Western Blot
1 x 120 µl	*Control Positivo anti-Hu/Yo (<i>vial con tapa morada</i>)
1 x 120 µl	*Control Negativo (<i>vial con tapa amarilla</i>).
1	Tarjeta de Control
1 x 250 µl	*Conjugado A (<i>vial con tapa azul</i>)
1 x 250 µl	*Conjugado B (<i>vial con tapa blanca</i>)
1 x 60 ml	*Diluyente de Suero
1 x 25 ml	Sustrato enzimático (<i>frasco ámbar</i>)
1 vial	*Tampón de Lavado en Polvo; reconstituir para un litro con agua desionizada o destilada.

3 Cubetas de ensayo**2 Formularios de Informe**

** Contiene < 0.1% NaN₃*

Materiales Necesarios pero no Suministrados

- Probeta graduada limpia de 1000 ml
- Pinzas no dentadas (Pinzas para filtros)
- Plataforma agitadora rotatoria o basculante
- Papel absorbente o toallas de papel
- Agua desionizada o destilada
- Botella que se pueda apretar para mantener el tampón de lavado diluido
- Pipetas capaces de suministrar 10 a 1000 µl
- Puntas de pipeta desechables
- Cronómetro

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Sólo se deben utilizar muestras de suero para este procedimiento. Las muestras extremadamente hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microorganismos pueden interferir con el desempeño de esta prueba y no deben ser utilizadas. Almacenar las muestras a 2-8°C durante no más de una semana. Para un almacenamiento más prolongado, el suero debe congelarse a -20°C. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PROCEDIMIENTO

Notas de Procedimiento

- Leer cuidadosamente el prospecto antes de comenzar con el ensayo.
- Permitir que las muestras de suero y los reactivos del ensayo se equilibren a temperatura ambiente durante ~30 minutos antes de iniciar el procedimiento de prueba. Retornar inmediatamente a la nevera todas las muestras y reactivos no utilizados después de su uso.
- La técnica apropiada de lavado es fundamental para la correcta ejecución del ensayo.
- Manipular las tiras de prueba sólo con unas pinzas limpias. No tocar con las manos desnudas.
- Las tiras están numeradas individualmente en la parte inferior de cada tira. Asignar números de identificación de la muestra a las respectivas tiras en el Formulario de Informe.
- Completar toda la información relevante en el Formulario de Informe antes de iniciar el ensayo.

Método de Ensayo

Paso 1 Con una pinza de punta roma, colocar el número necesario de **Tiras** etiquetadas hacia arriba en los pocillos individuales de la cubeta de ensayo.

Paso 2 Pipetear **1,0 ml** de diluyente de suero en cada pocillo.

Paso 3 Pipetear **10 µl** de Control Negativo y Positivo y la muestra del paciente en los pocillos apropiados para obtener una **dilución 1:101**. Incubar **60 minutos** (± 5 min.) a temperatura ambiente en un agitador rotatorio o basculante.

Paso 4 Aspirar la solución de la muestra al contenedor de residuos. Lavar bien las tiras con Tampón de Lavado mediante chorros de aproximadamente 2 ml de solución directamente sobre las tiras. Lavar las tiras con agitación suave durante **5 minutos** y aspirar la solución dentro de un contenedor de residuos. **Repetir 2**

veces. *Precaución: El lavado completo de las tiras entre incubaciones es esencial para obtener resultados válidos. El lavado inadecuado originará una alta tinción de fondo.*

- Paso 5** Pipetear **1,0 ml** de Diluyente de Suero seguido por **10 µl** de Conjugado en cada pocillo. Incubar **30 minutos** ($\pm$ 5 min.) a temperatura ambiente en un agitador rotatorio o basculante.
- Paso 6** Repetir el **Paso 4**.
- Paso 7** Pipetear **1,0 ml** de Diluyente de Suero seguido por **10 µl** de Conjugado B en cada pocillo. Incubar **30 minutos** ($\pm$ 5 min.) a temperatura ambiente en un agitador rotatorio o basculante.
- Paso 8** Repetir el **Paso 4**.
- Paso 9** Pipetear **1,0 ml** de Sustrato en cada pocillo e incubar con agitación suave **10 minutos** ($\pm$ 5 minutos) a temperatura ambiente y luz reducida.
- Paso 10** Detener el desarrollo con agua desionizada (2 x 1 minuto).
- Paso 11** Utilizando una pinza de punta roma, retirar las tiras de la cubeta de ensayo y colocarlas suavemente sobre papel absorbente. Manipular las tiras sólo por los extremos y dejarlas secar **15-20 minutos**.

Control de Calidad

Aunque las tarjetas de control son específicas del lote, los controles negativos y positivos se deben incluir en cada prueba para asegurar la correcta ejecución del ensayo.

Reacción de Control Positivo: Una densa y difusa banda azul-violeta debería aparecer a 35-40 kD, representando la reacción anti-Hu. Una densa y pronunciada banda azul-violeta debería aparecer a 62 kD representando la reacción anti-Yo. La tira de control positivo por lo general desarrollará bandas anti-Hu y anti-Yo conjuntamente con los marcadores internos a 125 kD y un doblete a 70-77 kD. Estas son las bandas de referencia internas. Además de estos marcadores, la tira de control positivo también mostrará un marcador azul 116 kD (véase la Figura 1).

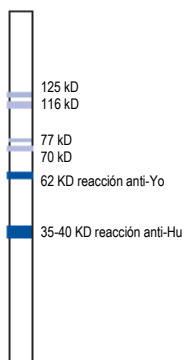
Reacción de Control Negativo: Típicamente, la reacción de control negativo hará que sólo aparezcan los marcadores de peso molecular internos a 125 kD y 70-77 kD. Del mismo modo, la tira de control negativo también muestra un marcador azul de 116 kD (véase la Figura 2).

RESULTADOS

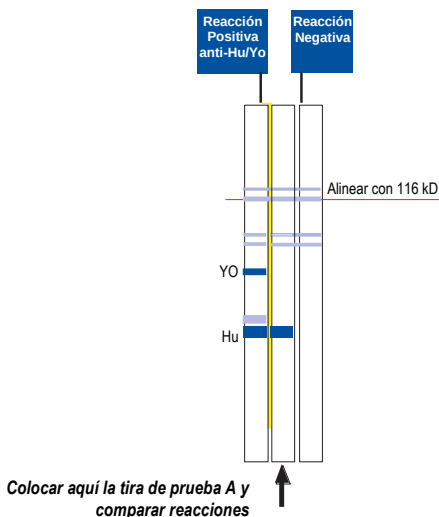
Directrices de Lectura e Interpretación

Las tiras de anticuerpo anti-neuronal ImmuBlot™ contienen marcadores de peso molecular 125, 70, y 77 kD. El marcador de alineación 116 kD sirve como una guía para alinear las tiras de la tarjeta de control (véase la Figura 2).

- Paso 1** Sostener la tira de la muestra de ensayo entre las tiras de control positivas y negativas sobre la Tarjeta de Control laminada proporcionada y alinear la tira de prueba utilizando el marcador de peso molecular 116 kD como el punto de referencia (véase la Figura 2).
- Paso 2** Alinear la tira de prueba en el centro de la tarjeta de control y comparar las reacciones de la tira de prueba con los de los controles a cada lado.

Figura 1**Figura 2**

Immublot™ anti-Neuronal ab.
Western Blot



Paso 3 Si la banda en la tira reactiva es ligeramente inferior a la línea de control anti-Yo y es de aproximadamente 55 kD debería considerarse una reacción anti-Ri. Una banda en la tira reactiva que se alinea con la línea de control anti-Yo debería considerarse una reacción anti-Yo. Una banda en la tira reactiva que se alinea con la línea de control anti-Hu más inferior (más oscura) debería considerarse una reacción anti-Hu. Las reacciones positivas también pueden ocurrir en diferentes intensidades, de débiles a fuertes. Las reacciones débiles deberían compararse con intensidades de reacción de referencia en la posición correspondiente en la tira de control negativo. La Figura 2 proporciona un ejemplo de un resultado positivo correctamente alineado.

Paso 4 Si no hay bandas de reacción visibles y/o bandas no correspondientes a cualquier banda anti-Hu (35-40 kD), anti-Yo (62 kD) o anti-Ri (55 kD) éstas deberían ser consideradas muestras negativas de antígeno nuclear anti-neuronal.

VALORES ESPERADOS

Existen fuertes *síndromes paraneoplásicos*, especificidades de anticuerpos anti-neuronales y tipo de tumor asociado. El síndrome paraneoplásico puede producirse meses o años antes de que se detecte un tumor. La presencia de autoanticuerpos neuronales ayuda en la detección del tumor subyacente. Los anticuerpos contra el Hu se detectan en aproximadamente el 20% de los pacientes con cáncer de pulmón, mientras que el anti-Yo y anti-Ri están presentes en aproximadamente el 2%-4% de los casos. Sin embargo, en una minoría de pacientes con síndrome paraneoplásico con anticuerpos anti-neuronales, no se puede encontrar ningún tumor. Ciertos pacientes con síndromes paraneoplásicos pueden no tener niveles de anticuerpos detectables de anticuerpos anti-neuronales. Un 5-6% de las pacientes con cáncer de Ovario tienen circulando anticuerpos anti-Ri en la ausencia de cualquier síndrome neurológico paraneoplásico¹⁰. La siguiente tabla representa la utilidad de las pruebas de anticuerpos para los anticuerpos anti-neuronales.

Importancia Clínica de los Anticuerpos anti-neuronales Paraneoplásicos¹¹⁻¹⁴

Anticuerpo Especificidad	Síndrome Neurológico Paraneoplásico	Tumores asociados con mayor frecuencia	Criterios para la detección de Western Immunoblot
Anti-Hu (ANNA-1)	Encefalomiелitis, neuropatía autonómica neuropatología sensorial.	Cáncer de pulmón de células pequeñas, neuro-Blastoma; rara vez cáncer de pulmón de células pequeñas,	Bandas reactivas 35-40 kD en extractos de neuronas CNS aisladas
Anti-Ri (ANNA-2)	Opsoclon, ataxia, disartria mareos nistagmo.	cáncer de próstata, seminoma. Cáncer de Mama, Cáncer de pulmón de células pequeñas	Bandas 55 y 80 kD en proteínas neuronales o con proteína recombinante
Anti-Yo (PCA-1)	Síndrome cerebeloso subagudo, disartria y nistagmo	Cáncer de ovario, cáncer de mama, otro cáncer ginecológico	Banda 62 kD y banda 34 kD en extractos de células Purkinje purificadas

Frecuencia y Tipos de Cáncer en Pacientes Seropositivos con Anticuerpos Paraneoplásicos¹⁷

Anticuerpo	% de Carcinomas Detectados							Pacientes con Cáncer Histológicamente Probado
	Pulmón SCLC	NSCLC	Mama	Ovario	Trompas de Falopio/ Útero	Timoma	Otro	
Hu (ANNA-1)	66	4	0	0	0	2	8	80%
Yo (PCA-1)	0	0	13	63	13	0	1	91%
Ri (ANNA-2)	21	14	21	0	0	0	0	57%

SCLC = carcinoma de pulmón de células pequeñas NSCLC = sin-SCLC

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El Anticuerpo Anti-Neuronal Western Blot ImmuBlot™ se debería utilizar como una ayuda en el diagnóstico. Los resultados positivos se pueden encontrar en otras condiciones autoinmunes y/o ciertas enfermedades infecciosas. Los resultados deben ser evaluados e interpretados por el médico o neurólogo a la luz de la historia clínica del paciente y otras pruebas de laboratorio. Algunos sueros pueden reaccionar con el marcador de Peso Molecular (MW, por sus siglas en inglés), cuya importancia no es conocida. Se recomienda que las reacciones positivas a 35-40 kD (anti-Hu), 62 kD (anti-Yo), y 55 kD (anti-Ri) sean respaldadas mediante el patrón de fluorescencia específica en el Anticuerpo Anti-Neuronal IFA ImmuGlo™ (Código del Producto: 1111).

GUÍA DE SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

- **Banda(s) intensa(s) en la tira de Control Negativo.** Causa probable: Vial de Control Negativo contaminado, o contaminación cruzada desde el pocillo que contiene un suero positivo.
- **El Control Positivo se asemeja a la tira de Control Negativo.** Causa probable: El vial de Control Negativo fue confundido como el vial de Control Positivo.
- **Las tiras están completamente en blanco.** Causa probable: Se omitió la adición del

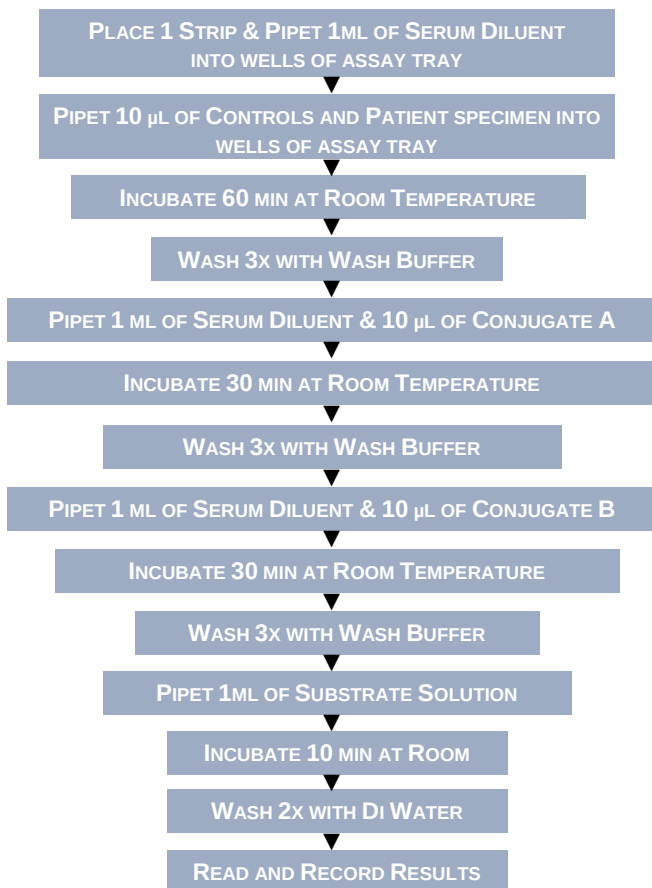
Conjugado (A o B) o del Sustrato.

- **Alto fondo y pobre contraste entre las bandas y el fondo.** Causa probable: Pueden haberse omitido los pasos de lavado(s) o han sido incorrectamente realizado(s), o las incubaciones fueron excesivas.

REFERENCES

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. Dricek 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.
11. 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.
12. Greenlee JE, Brashear HR. Antibodies to cerebellar purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinoma. *Ann Neurol*; 14:609-613, 1983.
13. 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.
14. 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.
15. Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ et al. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer - A quantitative western blot analysis. *Ann Neurol*; 27:544-552, 1990.
16. Cunningham J, Graus F, Anderson N et al. Partial characterization of the Purkinje cell antigens in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Neurology*; 36:1163-1168, 1986.
17. Pittock S et al. Autoantibody Profiles of Cancer. *Ann Neurology*. 56: 715-719, 2004.

ImmuBlot™ PROCEDURE AT A GLANCE



For technical assistance please contact:



 **IMMCO Diagnostics, Inc.**
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé
EMERGO Europe
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
www.emergogroup.com

