

ravo PNS-Blot
REKOMBINANTNÍ IMUNOBLLOT
PRO DETEKCI PARANEOPLASTICKÝCH AUTOPROTILÁTEK
anti-HuD, Anti-Yo, anti-Ri, anti-CV2 (anti-CRMP5),
anti-Amphiphysin, anti-Ma1 a anti-Ma2

12 nebo 24 stanovení

In vitro diagnostický zdravotnický prostředek

IVD

Verze 01/2021-1

Prosím věnujte pozornost rozdílům zvýrazněným šedě ve srovnání s předchozí verzí 04/2020 a 01-2021

Nové rozložení a upravené provedení testu

Použití:

Ravo PNS Blot je manuální kvalitativní lineární imunoanalýza pro detekci paraneoplastických autoprotilátek anti-HuD, anti-Yo, anti-Ri, anti-CV2, anti-Amphiphysin, anti-Ma1 a anti-Ma2 v lidském séru, plazmě a mozkomíšním moku.

Stanovení je určeno pro profesionální laboratorní použití v případech podezření na paraneoplastický syndrom (screening) a / nebo pro potvrzení předběžných výsledků, např. imunofluorescenčního testu.

Souhrn:

Paraneoplastické neurologické syndromy (PNS) jsou skupinou neurologických onemocnění asociovaných s nádorem a jejich metastázami, které nejsou příčinou syndromu. Za patofyziologický mechanismus, který je za ním je pokládán autoimunitní proces. Specifické antineuronální autoprotilátky mohou být detekovány u většiny pacientů s PNS. Přítomnost dobře charakterizované autoprotilátky **anti-HuD, anti-Yo, anti-Ri, antiCV2/CRMP5, anti-Amphiphysin, anti-Ma1 and anti-Ma2** i v přítomnosti paraneoplastického neurologického symptomu poskytuje silný diagnostický průkaz možného okultního neoplasmu. Ve dvou třetinách případů předchází paraneoplastický neurologický syndrom zjištění za ním stojícího neoplasmu až o pět let. Tudíž zjištění paraneoplastických neuronálních autoprotilátek může vést k časně diagnostice rakoviny (tabulka 1-10).


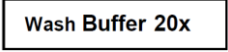

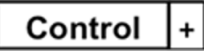

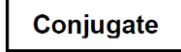
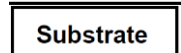
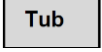

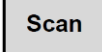








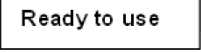
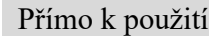
Tabulka: Nejčastější paraneoplastické neurologické syndromy asociované s tumory

Anti-Hu-Protílátky (ANNA-1)	Sensorová a autonomická neuropatie Cerebelární ataxie Encephalomyelitida Limbická Encefalitida	Malobuněčná rakovina Nemalobuněčná rakovina plic Extrapulmonární malobuněčný karcinom
Anti-Yo-Protílátky (Antigen Purkyňových buněk)	Cerebelární ataxie	Rakovina prsu Rakovina ovarií Rakovina uteru
Anti-Ri-Protílátky (ANNA-2, anti-Nova-1)	Brainstem encephalitis (incl. Opsoclonus-Myoclonus-Syndrome) Cerebelární ataxie	Rakovina prsu Malobuněčná rakovina plic Medulární rakovina štítné žlázy
Anti-CV2-(CRMP5-) Protílátky	Sensorová a autonomická neuropatie Cerebelární ataxie Encephalomyelitida Limbická Encefalitida Autonomická neuropatie Chorea	Malobuněčná rakovina plic Brzlík
Anti-Amphiphysin- Protílátky	Stiff-person-syndrom Various symptoms	Rakovina prsu Malobuněčná rakovina plic
Anti-Ma1 and Anti-Ma2- (Ta-) Protílátky	Limbická Encefalitida Brainstem encephalitis* Cerebelární ataxie	Rakovina plic Rakovina plic

* Brainstem encephalitis a cerebelární ataxie jsou obvykle asociovány s rozdílnými tumory od testikulárních a imunoreaktivitou proti proteinům Ma2 and Ma1.

Obecně byly tyto autoprotilátky identifikovány pomocí imunohistochemických metod. Kvůli problémům se specificitou je třeba pozitivní výsledek v imunohistochemii konfirmovat pomocí imunoblotu, používajícího surové extrakty z neuronálních tkání jako antigenu. Imunohistochemie je také pracná a vyžaduje vysoký stupeň zkušeností pro spolehlivou interpretaci.

Reagencie, pokyny k bezpečnosti a symboly

Složky a popis	Množství/objem	Bezpečnostní pokyny	Symboly
Nitrocelulosové-Stripy s rekombinantními antigeny HuD, Yo, Ri, CV2 (CRMP-5), Amphiphysin, Ma1 and Ma2 zelený šroubovací uzávěr	12 x (PNS-12) 24 x (PNS-24)	-----	
Promývací pufr, 20 x koncentrát, modrý šroubovací uzávěr	1 x 50 ml (PNS-12) 2 x 50 ml (PNS-24)	-----	
Ředící pufr pro vzorky, přímo k použití, zelený šroubovací uzávěr	1 x 20 ml (PNS-12) 2 x 20 ml (PNS-24)	A	
Pozitivní kontrola, koncentrát, fialový šroubovací uzávěr	1 x 50 µl	A	
Negativní kontrola, koncentrát, bezbarvý šroubovací uzávěr	Reagencie dostupná na vyžádání	A, B	
Konjugát (Alkaline Phosphatase IgG-Conjugate) pro vzorky a kontroly přímo k použití, červený šroubovací uzávěr	1 x 14 ml (PNS-12) 2 x 14 ml (PNS-24)	A	
Roztok substrátu, BCIP/NBT přímo k použití, černý šroubovací uzávěr	1 x 14 ml (PNS-12) 2 x 14 ml (PNS-24)	C	
Inkubační žlábký	1 x (PNS-12) 2 x (PNS-24)	-----	
Návod k použití	1 x	-----	
Kontrolní scan	1 x	-----	
Templát (specifický pro šarži)	1 x	-----	
 In vitro diagnostický zdravotnický prostředek  Šarže  Výrobce  Katalogové číslo		 Počet aplikací  Skladujte při X-X °C  Expirace  	

Další reagencie dostupné na vyžádání:

Negativní kontrola 50 µl koncentrát obsahuje 0,03% ProClin300
 Kat.č.: PNSNKO bezbarvý šroubovací uzávěr

Bezpečnostní pokyny

A. Obsahuje materiál ze zvířecích zdrojů. Přestože se používá pouze materiál od zdravých zvířat, měly by se tyto materiály obecně považovat za potenciálně infekční a mělo by se s nimi zacházet podle toho.

B. Obsahuje materiál lidského původu.

Přestože komponenty byly testovány na přítomnost HbsAg a protilátek proti HIV-1, HIV-2 a HCV a byly shledány negativními, měly by být obecně považovány za potenciálně infekční a mělo by se s nimi odpovídajícím způsobem zacházet.

C. Zabraňte kontaktu s roztokem substrátu.

Potřebný materiál, který však není součástí testovací sady

Destilovaná voda

Kleště na pipety s jednorázovými špičkami (např. 5 - 10 μ l, 10 - 100 μ l, 100 - 1000 μ l)

Odměrné válce a / nebo Erlenmeyerovy baňky

Vortexový mixér

Třepačka

Časovač

Blotovací papír

Jednorázové ochranné rukavice

Reaction control R

Princip / Rozložení:

Nitrocelulosové stripy coatované rekombinantními antigeny HuD, Yo, Ri, CV2 (CRMP5), Amphiphysin, Ma1 and Ma2 jsou inkubovány se vzorkem séra pacienta

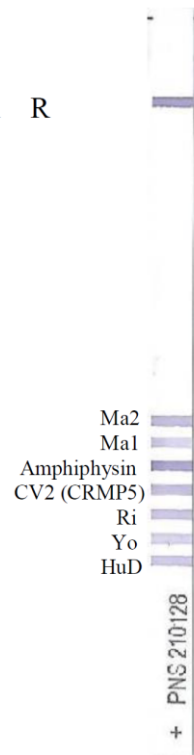
Specifické protilátky ve vzorku se vážou na antigeny

Nespecifické molekuly v sérovém vzorku jsou promytím stripu odstraněny.

Navázané protilátky jsou detekovány pomocí protilidského

IgG konjugovaného alkalickou fosfatázou pomocí

BCIP/NBT jako substrátu.



Skladování

Všechny součásti soupravy otevřené nebo uzavřené jsou stabilní dod data expirace při skladování +2-8°C. Zředěný promývací pufr je stabilní 4 týdny skladovaný při +2 až +8°C.

Vzorky:

Doporučuje se testovat čerstvě odebrané vzorky (sérum, plazma nebo cerebrospinální tekutina). Pro dlouhodobé skladování (několik měsíců) by měl být vzorek skladován v alikvotech při -20° C. Zabraňte opakovanému rozmrazování a zmrazování.

Kontaminace vzorků může vést k falešně pozitivním nebo negativním výsledkům. Kontaminované vzorky by neměly být používány.

Rekonstituce:

- Ujistěte se, že všechny součásti soupravy mají před použitím pokojovou teplotu.
- Zřed'te koncentrát promývacího pufru 1:20 destilovanou vodou. **Během skladování při nízkých teplotách se v koncentrovaném promývacím pufru mohou vytvořit krystaly. Ty je třeba před ředěním rozpustit při 37 °C 30 minut a před použitím nechat vychladnout na pokojovou teplotu.** Zředěný promývací pufr je stabilní 4 týdny při skladování +4 až +8° C.
- Testování cerebrospinální tekutiny (CSF) a detekce syntézy intrathekálních specifických autoprotilátek je popsáno na straně 6.

Postup:

Nitrocelulosové stripy jsou značeny na spodu (není-li uvedeno jinak). Musí se inkubovat značením vzhůru a během všech inkubačních kroků by měly být zcela ponořeny do kapaliny.

Pokryjte stripy 1 ml ředícího pufru.

Přidejte 5 µl pozitivní kontroly nebo vzorku přímo ke stripu

Konečné ředění 1:200

Nebo alternativně:

Předřed'te vzorky séra a pozitivní kontroly 1:2 (tj 10 µl séra a 10 µl pufru na vzorky) a přidejte 10 µl ke každému stripu

Konečné ředění 1:200

Dobře promíchejte. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě na třepačce.

- Promyjte zředěným promývacím pufrům: Opatrně odstraňte kapalinu z každého stripu. Přidejte ca. 1 ml zředěného promývacího pufru ke každému stripu a třeptejte ca. 30 vteřin. Opakujte pětkrát.
- Přidejte 1 ml IgG konjugátu alkalické fosfatázy připraveného k použití ke každému stripu.

Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě na třepačce.

- Promyjte zředěným promývacím pufrům : Opatrně odstraňte kapalinu z každého stripu. Přidejte ca. 1 ml zředěného promývacího pufru ke každému stripu a třeptejte ca. 30 vteřin. Opakujte pětkrát.

- Přidejte 1 ml substrátového roztoku připraveného k použití ke každému stripu.

**Inkubujte 20 minut při pokojové teplotě dokud se neobjeví viditelné linie .
Pro srovnání použijte kontrolní scan.**

- Reakci zastavte destilovanou vodou: Opatrně odsajte kapalinu pomocí pipety z každého stripu. Přidejte ca 1 ml destilované vody ke každému stripu a třepajte ca 30 vteřin. Opakujte pětkrát.
- Položte stripy na filtrační papír a nechte je uschnout alespoň 2 hodiny. Interpretujte výsledky. Stripy skladujte v temnu.

Testování cerebrospinální tekutiny (CSF), detekce syntézy intrathekálních specifických autoprotilátek:

Vezměte prosím na vědomí: detekce intratekální syntézy autoprotilátek je možná pouze tehdy, je-li testován spárovaný vzorek sérum-csf se stejnou koncentrací IgG.

- Stanovení celkové koncentrace IgG v páru vzorků sérum-CSF
- Zřed'te oba vzorky: sérum i CSF, v pufru vzorků (hotový k použití) na koncentraci 1 mg/l jako pracovního roztoku (viz příklad)
- Provádějte test paralelně jak popsáno výše Použijte 1 ml každého z vypočítaného ředění.

Příklad:

1 mg/l	Stanovená koncentrace IgG	Ředění
CSF	97,3 mg/l	1: 97
Sérum	10,8 g/l	1 : 10.000

Srovnejte intenzitu linií páru sérum-CSF.

Intenzivnější linie pro vzorek CSF-naznačuje syntézu intrathekálních specifických protilátek. Je-li intenzita v páru sérum-CSF-téměř stejná, pomohlo by interpretaci usnadnit opakování testu při koncentraci IgG - 0.1 mg/l .

Je také možné testovat vzorky CSF neznámé koncentrace IgG, ale pak není možné získat výsledek intrathekální syntézy autoprotilátek.

CSF o netnámé koncentraci IgG dooručujeme testovat v ředědní 1:4 (250µl CSF plus 750 µl Sample Buffer.

Vizuální Interpretace:

Položte stripy vedle sebe pro odečtení proteinů. Měly by být srovnávány pouze stripy stejné šarže.

Pozitivní kontrola, templát a kontrolní scan pomohou určit linie, na dokumentační list je možné stripy nalepit pomocí průhledné lepící pásky nebo lepící tyčinkou pro další dokumentaci.

Poznámka: lepicí pásku nepřilepujte přes linie. Pomocí lepicí tyčinky by lepidlo nemělo přijít do styku s liniemi. Lepidlo může vést ke změnám barvy nebo nespecifickým reakcím.

Zarovnejte proužky s kontrolou reakce podél označené čáry. Přiřaďte proteiny pomocí šablony specifické pro šarži a výsledek zadejte do dokumentace.

Obvykle jsou silné linie pozorovány ve vzorcích sér pacientů s klinicky definovaným paraneoplastickým syndromem.

Význam slabých reakcí není dosud znám s výjimkou autoprotilátek proti HuD. Byly popsány slabé reakce autoprotilátek proti HuD u 18% pacientů trpících malobuněčnou plicní rakovinou bez paraneoplastického neurologického onemocnění. Tudíž v případě nálezu nízkých koncentrací protilátky anti-Hu doporučuje se důsledné hledání možného nádoru. V současnosti nejsou známy další možné incidence nádorů které by mohly být příčinou výskytu nízkých koncentrací ostatních antigenů, takže není možné uvést jasná další doporučení.

.V tom případě se doporučuje provádět alespoň kontrolu stavu protilátek s ohledem na onemocnění.

Automatické odečítání: pomocí softwaru B4C od BioScitec

Line lze odečítat automaticky pomocí skeneru a softwaru B4C od BioScitec (další informace a příslušné softwarové licence jsou k dispozici na vyžádání od společnosti ravo).

Reaktivita Ma1/Ma2

Ma1 - / Ma2 +:

Je-li sérum pacienta reaktivní výlučně s antigenem Ma2 antigen naznačuje to testikulární rakovinu jako příčiny malignity.

Ma1 + /Ma2 + :

Přítomnost obou protilátek specifických pro antigeny Ma1 a Ma2 dokazuje paraneoplastickou etiologii neurologického onemocnění ale nenaznačuje specifický typ rakoviny.

Sensitivita:

Antigen	Počet vzorků	Pozitivní %
HuD	49	100 %
Yo	31	100 %
Ri	19	100 %
CV2 (CRMP5)	93	100 %
Amphiphysin	19	100 %
Ma1	5	100 %
Ma2	14	100 %

Specificita:

Bylo testováno 200 vzorků dárců krve pro stanovení specificity testu. 3/200 vzorků vykazovalo velice jemné linie což znamená specificitu 98,5 %

Zkřížené reaktivity:

V následující skupině nebyly pozorovány žádné falešně pozitivní reakce:

Paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD): n = 31

Idiopathic cerebellar ataxia: n = 39

Idiopathic sensory neuropathy: n = 20

Limbic encephalitis (no onconeural antibodies): n=21

Breast cancer – rakovina prsu (no PNS): n=20

Omezení metody

Interpretace výsledků laboratorních testů musí být vždy prováděna v kontextu klinických příznaků.

Některé vzorky dávají více či méně fialové pozadí kvůli složkám séra neznámého původu a interpretace výsledků je proveditelná jen částečně. Takové vzorky by měly být znovu testovány pomocí jiné metody, např. IFA.

Interference mohou být možné po podání intravenózních imunoglobulinů (tzv. IVIG). V současné době nejsou známy žádné další interference s léky.

Po plazmaferéze mohou být předběžné pozitivní výsledky slabé nebo negativní.

Interferující substance:

Ačkoliv nebyla pozorována interference pro hemoglobin až do koncentrace 2 mg /ml, bilirubin až do koncentrace 0.2 mg /ml a triglyceridy až do koncentrace 32 mg /ml, hemolytické, ikterické a lipemické vzorky by neměly být používány, není-li to nutné.

Odkazy:

1. O,Stich, S.Rauer. Paraneoplastische Neurologische Syndrome. Der Nervenarzt. 2013; 4
2. S. Rauer. Paraneoplastische Neurologische Syndrome. Fortschr Neurol Psychiatr. 2011;79(1):51-8; quiz 59-61. Review.
3. Oliver Stich, Sven Jarius, Christiane Rasiah, Raymond Volz und Sebastian Rauer. Recombinant immunoblot for assessment of intrathecally synthesized paraneoplastic antineural antibodies in cerebrospinal fluid from patients with paraneoplastic neurological syndromes. Clin Chem Lab Med 2008;46(12):1793-1795.
4. Lisa M. DeAngelis and Jerome B. Posner. Neurologic Complications of Cancer. Oxford University Press 2008 Second Edition
5. F. Graus, J.Y. Delattre, J. C. Antoine, J. Dalmau, B. Giometto, W. Grishold, J. Honnorat, P. Sillevs Smitt, Ch. Vedeler, J. J. G. M. Verschuuren, A. Vincent, R. Voltz, for the Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004;75:1135-1140.
6. Voltz R. Paraneoplastische neurologische Autoimmunerkrankungen. Nervenarzt 2002;73:909 – 929.
7. Honnorat J., Antoine J.C., Derrington E., Aguqra M., Belin M.F. Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry 1996;61(3): 270-8.

8. Sillevs-Smitt P., Manley G., Dalmau J., Posner J.B. Pitfalls in the diagnosis of autoantibodies associated with paraneoplastic neurologic disease. Neurology 1996;46:1739-1741.
9. Moll J.W., Antoine J.C., Brashear H.R. et al. Guidelines on the detection of paraneoplastic anti-neuronalspecific antibodies: report from the Workshop to the fourth Meeting of the International Society of NeuroImmunology on paraneoplastic neurological disease. Neurology 1995;45:1937-1941.
10. Moll J.W., Vecht C.J. Immune diagnosis of paraneoplastic neurological diseases. Clin. Neurol. Neurosurg. 1995;97: 711-81.
11. Dalmau J., Posner J.B. Neurologic paraneoplastic antibodies (anti-Yo; anti-Hu; anti-Ri): the case for a nomenclature based on antibody and antigen specificity. Neurology 1994;44:2241-2246.

Kat. číslo:

REF

PNS-12 (12 Stanovení)

PNS-24 (24 Stanovení)

Výrobce:



ravo Diagnostika GmbH

Oltmannsstrasse 5

D-79100 Freiburg, FRG

Tel.: +49-(0)761-40 74 88

Fax: +49-(0)761-40 74 77

E-mail: info@ravo.de

Distribuce:

Asco-Med spol. s r o

Pod Cihelnou 6/664

161 00 Praha 6

Tel.: 233 313 578

GSM: 602 653 640

E-mail: asco@ascomed.cz

E-mail: irena.sejbova@ascomed.cz

01/2021