



ImmuGlo™

Anti-Neuronal Antibody IFA

IVD

PRODUCT INSERT

REF

Code 1111

48 Determinations

INTENDED USE

An indirect immunofluorescence (IFA) antibody test for the detection and semi-quantitation of anti-neuronal (*paraneoplastic*) autoantibodies; anti-Yo, anti-Hu and anti-Ri in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

Autoimmune responses of the central nervous system (CNS), recognized as *paraneoplastic neurologic disorders* are manifestations of an antitumor immune response. These consist of a variety of neurological disorders like *Paraneoplastic encephalomyelitis (PE)*, *Paraneoplastic sensory neuropathy (PSN)*, *Paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD)*, *Paraneoplastic opsoclonus myoclonus ataxia (POMA)* and *Stiffmann syndrome*¹⁻³. Reliable diagnosis of such conditions and 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, Type I anti-neuronal nuclear antibody (ANNA-1) is associated with small cell lung cancer (SCLC) resulting in PE.
- b) Anti-Yo, anti-purkinje cell antibodies (PCA-1) is associated with ovarian and breast carcinomas resulting in PCD.
- c) Anti-Ri, Type II anti-neuronal nuclear antibody (ANNA-2) is associated with neuroblastoma in children and fallopian or breast cancer resulting in POMA.

The presence of one of these antibodies supports the clinical diagnosis of *paraneoplastic syndrome* and leads to a focused search for underlying neoplasm. These markers also help in discriminating between true paraneoplastic disorders and other inflammatory disorders of the nervous system that mimic a paraneoplastic syndrome.

Indirect immunofluorescence provides a sensitive method of detecting these autoantibodies. Anti-Hu/anti-Ri autoantibodies, which characteristically stain the granular cell nucleus, are easily distinguished from the Purkinje cell cytoplasm staining anti-Yo antibodies. However, to facilitate distinction between Hu and Ri autoantibodies we have designed a triple substrate. This triple substrate presentation also identifies and eliminates anti-nuclear antibodies from the specific screening of the paraneoplastic autoantibodies. If the specimen yields no immunoreactivity by immunofluorescence the result is reported as negative. The specificity of those determined positive by IFA could then be confirmed by Western immunoblotting method.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

Antibodies to Hu (ANNA 1), Yo1 (PCA-1), and Ri (ANNA2) are detected by indirect IF using a substrate composite of sections of monkey cerebellum, rodent gut and liver. In this IFA

method, patient sera are incubated on the sections to allow binding of antibodies to the specific antigens of the substrate. Any immunoglobulins and other serum proteins not bound to the tissue sections are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled antihuman IgG conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of antibodies of a specificity is determined by their specific reactions to the cerebellar neurons (Purkinje, molecular or granular cells) and myenteric plexus neurons in the gut.

PRODUCT INFORMATION

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.

Materials Provided

ImmuGlo™ anti-Neuronal IFA **REF** 1111

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

8 x	SORB SLD 6	6 well cerebellum-rodent intestine/ liver substrate slides
1 x 0.5 ml	CONTROL + HU *	Hu (ANNA-1) Positive Control
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB *	Anti-Human FITC Conjugate. Ready to use. Protect from light.
1 x 60 ml	BUF *	Sample Diluent.
2 vials	BUF WASH	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Mounting Medium. Do not freeze.
1 x 12	COVER SLD	Coverslips. Reconstitute to one liter each.

* Contains < 0.1% NaN₃

Optional Components

1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Goat antihuman IgG FITC Conjugate. Ready to use. Protect from light. (2099X)
1 x 1.0 ml	EVANS	Evan's Blue Counterstain. (2510)

Materials Required But Not Provided

Fluorescence microscope
 Micropipette or Pasteur pipette
 Serological pipettes
 Staining dish (e.g. Coplin jar)
 Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack
 Distilled or deionized water
 1 liter container
 Wash bottle
 Paper towels
 Incubation chamber

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HbsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials⁹.

WARNING - Sodium azide (NaN₃) 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. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from IMMCO. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

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

Test Method

A. Screening

1. Dilute each patient serum **1:10** with the Buffered Diluent provided (0.1 ml serum + 0.9 ml Diluent). **Do not** dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for **10-15 minutes**. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50 µl) of the **Negative Control** to well #1. Similarly apply **1 drop** of **Positive Control** to well #2. Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur pipette, apply **1 drop** of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides **30 minutes** at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10 ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use a wash bottle. Transfer slide immediately into a Coplin jar filled with PBS and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides.
8. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the **Conjugate** dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50 µl) to each well. Repeat process with all remaining slides.
9. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate **30 minutes** at room temperature.
10. Remove a slide from the incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides. If desired, **2-3 drops** of Evans blue counterstain may be added to the final wash.

NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.

11. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **While slide is still wet mount the coverslip.** Place **3 drops** of the Mounting Medium evenly spaced on a coverslip placed on a paper towel and invert the slide onto the coverslip. To remove any air bubbles gently apply pressure along the edge of the coverslip. Avoid any movement of the coverslip. Repeat process with all remaining slides
12. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of **200x** or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of an antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed. Slides should be stored in the dark at 2- 8°C.

B: End Point Determination (Titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following **Steps 4 through 15** to determine the titer. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial twofold dilutions starting at 1:10 (see below). Using one slide, a serum may be tested at dilutions ranging from 1:10 to 1:320. If positive at a 1:320 dilution, the titer is reported as greater or equal to 320. Additional slides may be used to obtain endpoints for those sera still positive at a 1:320 dilution. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

Preparation of Serial Dilutions

Number six tubes 1 through 6. Add 0.9 ml of Buffered Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 6. Pipette 0.1 ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2 ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2 ml from one tube to the next after mixing to yield the dilutions depicted in the following table:

Tubes	1	2	3	4	5	6
Serum	0.1 ml					
	+					
Buffered Diluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Transfer	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Final dilution	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

Quality Control

Both Positive and Negative Controls should be included with each test run. The negative control should show no specific fluorescence of the neurons, whereas the positive control should have 1+ or greater staining intensity.

If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control.
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope. These may include: improper alignment, use of the bulb beyond useful life expectancy, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.

RESULTS

Results of the test for anti-neuronal antibodies should be reported as negative (<10) or positive with titer. The specificity of the antibody reaction is determined as presented in

Table 1 and Figures 1 and 2 at the end of this document

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

In some cases, sera positive for anti-neuronal antibodies may either be very weak or negative at the initial screening dilution (prozone phenomenon). In such doubtful cases the sera should be retested at higher dilutions and, if positive, antibody titers determined.

The presence of two or more antibodies in a serum reacting with the substrate may cause an interference in their detection by immunofluorescence and may cause either a failure to detect anti-neuronal antibodies or a suppression of the titer. In such cases, tests could be performed by Western Immunoblotting. It is recommended that all positive samples be confirmed for antibody specificity by western immunoblotting techniques.

EXPECTED VALUES

There is a strong association among *paraneoplastic syndromes*, anti-neuronal antibody specificities and the associated tumor type. 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 levels (by IFA) of anti-neuronal antibodies. Most cases who develop PCD in association with Hodgkin's disease, non-SCLC, gastrointestinal carcinomas, do not have demonstrable anti-Yo antibodies. There also exist anti-Yo negative but atypical anti-Purkinjee cell cytoplasm autoantibodies (atypical APCA's). Such antibodies can occur in association with Hodgkin's disease, *adenocarcinoma* of the lung, colon, or prostate¹⁰. 5-6% patients with ovarian cancer have circulating anti-Yo or anti-Ri antibodies in the absence of any paraneoplastic neurological syndromes¹¹. Table 2 at the end of this document indicates the utility of antibody tests for anti-neuronal antibodies.



ImmuGlo™

Anti-Neuronal Anticorp IFA

IVD

REF

1111

48 déterminations

Un essai d'anticorps de l'immunofluorescence indirect (IFA) pour la détection et le semi-quantification des autoanticorps anti-neuronal (*paraneoplastic*); anti-Yo, anti-Hu et anti-Ri en sérum humain.

GENERALITES

Les réponses autoimmunes du système nerveux central (CNS), identifiées en tant que *désordres neurologiques paraneoplastic* sont des manifestations d'une immuno-réaction antitumorale. Celles-ci se composent d'une variété de désordres neurologiques comme *l'encéphalomyélite paraneoplastic (PE)*, *la neuropathie sensorielle paraneoplastic (PSN)*, *la dégénération cérébelleuse paraneoplastic (PCD)*, *le paraneoplastic opsoclonus myoclonus ataxia (POMA)* et *le syndrome de Stiffmann*¹⁻³. Le diagnostic fiable d'un tel états et détection de la tumeur fondamentale est difficile. Dans un nombre significatif de cas en fait, la tumeur fondamentale n'est pas découverte jusqu'à ce que le patient se présente avec les symptômes neurologiques^{4,5}. *Des désordres paraneoplastic* sont caractérisés par la présence des anticorps anti-neuronals sérum de patient. La détection de ces autoanticorps est utile pour le clinicien car elle représente la présence d'une tumeur fondamentale. Les tumeurs qui ont été connues pour lancer des désordres paraneoplastic sont *le cancer poumon de petit-cellule, la neuroblastoma, le sein, et les ovariens et testiculaires*. Les autoanticorps suivants sont trouvés dans *des syndromes paraneoplastic*⁶⁻⁸:

La présence des anticorps

- a) **Anti-Hu, Type I anticorps anti-neuronal nucléaire (ANNA-1) est associé au cancer de poumon de petit cellules ayant pour résultat le PE.**
- b) **Anti-Yo, anticorps de cellules anti-purkinje (PCA-1) est associé aux carcinomes de ovariens et de sein ayant pour résultat PCD.**
- c) **Anti-Ri, Type II anticorps anti-neuronal nucléaire (ANNA-2) est associé au cancer de neuroblastoma (enfants) et de fallope ou de sein ayant pour résultat POMA.**

La présence d'un de ces anticorps soutient le diagnostic clinique du *syndrome paraneoplastic* et mène à une recherche focalisée de néoplasme fondamental. Ces marqueurs aident également en distinguant entre de véritables désordres paraneoplastic et d'autres désordres inflammatoires du système nerveux qui imitent un syndrome paraneoplastic.

L'immunofluorescence indirecte fournit une méthode sensible de détecter ces autoanticorps. Des anticorps de anti-Hu/anti-Ri, qui souillent caractéristiquement le noyau granulaire de cellules, sont facilement distingués du cytoplasme de cellules de Purkinje souillant des anticorps de anti-Yo. Cependant, pour faciliter la distinction entre les autoanticorps de Hu et de Ri nous avons conçu un substrat triple. Cette présentation de substrat de triple également identifie et élimine des anticorps anti-nuclear du criblage spécifique des autoanticorps paraneoplastic. Si le spécimen ne rapporte aucun immunoréactivité par l'immunofluorescence le résultat est rapporté en tant que négatif. La spécificité des ces positif déterminé par IFA a pu alors être confirmée par la méthode immunoblot.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Anticorps à Hu (ANNA 1), Yo1 (Pca-1), et Ri (ANNA2) sont détectés par l'immunofluorescence indirecte en utilisant un composé de substrat des sections du cervelet de primate, de l'intestin de rongeur et du foie. Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce coffret, le sérum du patient est incubé sur des substrats, ce qui permet la fixation des autoanticorps avec le substrat. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgG humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps fixés de classe IgG. Les réactivités sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert-pomme des réactions spécifiques aux neurones cérébelleux (cellules Purkinjes, moléculaires ou granulaires) et neurones de myenteric plexus dans l'intestin.

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs entre 2°et 8°C. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Avant utilisation, attendre que les réactifs s'équilibrent à la température ambiante du laboratoire.

Matériel fourni

ImmuGlo™ Anti-Neuronal Antibody IFA **REF** 1111

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 48 déterminations chacune.

8 x	SORB SLD 6	Lames 6 puits de cervelet de primate— intestin/ foie de rongeur
1 x 0,5 ml	CONTROL + HU *	Contrôle positif HU (ANNA-1) , sérum humain avec de la BSA
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Contrôle négatif , sérum humain avec de la BSA
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB *	Conjugué FITC anti-IgG humaines avec de la BSA. Maintenir à l'abri de la lumière
1 x 60 ml	BUF *	Diluant sérum , avec de la BSA
2 vials	BUF WASH	Tampon phosphate salin (PBS) . Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Milieu de montage . Ne pas congeler
1 x 12	COVER SLD	Lamelles couvre-lames

* Contient < 0.1% NaN₃

Autres réactifs disponibles

1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC	Conjugué FITC anti-IgG humaines avec de la BSA. Maintenir à l'abri de la lumière (2099X)
----------	-------------------------------	---

1 x 1,0 ml **EVANS**

Contre colorant Bleu d'Evans
(2510)

Matériel nécessaire mais non fourni

Microscope à fluorescence
Micropipette ou pipette Pasteur
Pipette sérologique
Bac à coloration pour le lavage des lames
Petits tubes (ex 13X75 mm) et portoir
Eau distillée ou déionisée
Epruvette graduée 1l
Flacon pour solution de lavage
Serviettes en papier
Chambre d'incubation

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic in vitro. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et trouvé non réactif en antigène de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti VIH1, anti VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage⁹.

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium. Ce composé peut former avec des canalisations de plomb ou de cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, lors de l'élimination de ces réactifs dans un évier, rincer l'évier à grande eau.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du coffret composants par d'autres provenant d'autres fabricants.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Seuls les sérums peuvent être utilisés dans ce test. Il est recommandé de ne pas les utiliser les sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne pouvant provoquer des interférences avec les performances du test. Conserver les sérums à 2-8°C pendant une semaine au maximum. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

MODE OPÉRATOIRE

A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:10 dans le diluant échantillon fourni (0.1 ml de sérum + 0.9 ml de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des autoanticorps dans le cas où le dépistage sera trouvé positif.
2. Laisser revenir les lames à la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat.
3. Numéroter les lames et les placer en chambre humide avec des serviettes papier mouillées pour éviter l'assèchement.
4. Appuyer doucement sur le flacon pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puits #1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif sur le puits #2. Eviter de déborder des puits.
5. Avec une micropipette ou une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder les puits.

6. Recouvrir la chambre humide et incuber les lames 30 minutes à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre humide. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette et environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un bécher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
8. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Déposer la lame dans la chambre humide. Déposer immédiatement 1 goutte de conjugué dans chaque puits.
9. Répéter les étapes 7 et 8 avec chaque lame.
10. Recouvrir la chambre humide et incuber 30 minutes à température ambiante.
11. Sortir une lame de la chambre humide. Plonger la lame dans un bécher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Si une contre-coloration est souhaitée, ajouter 2-3 gouttes de Bleu d'Evans dans le dernier bain de lavage. Répéter les opérations avec toutes les lames.
NOTE : Le lavage inexact peut mener à la fluorescence accrue de fond.
12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est humide.
13. Déposer doucement 3 gouttes de milieu de montage dans la lamelle couvre-lame également et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.
14. Répéter les étapes 12 et 13 avec chaque lame.
15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement X200 ou plus.

Les lames peuvent être lues immédiatement. Cependant, grâce à la présence d'un agent anti-fading dans le milieu de montage, la lecture peut être retardée jusqu'à 48 heures sans perte significative de l'intensité de fluorescence. Dans ce cas les lames doivent être conservées à l'obscurité à 2-8°C.

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les étapes 5 à 13 afin de définir son titre. Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à partir du 1:10. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive. Préparation des dilutions en série. Numéroter quatre tubes de 1 à 6. Ajouter 0.9 ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 4. Pipetter 0.1 ml de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant et après agitation répéter la même opération pour les tubes suivants comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

Tubes	1	2	3	4	5	6
Sérum	0.1 ml					
	+					
Diluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Echantillon						
Transfert		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Dilution finale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne donne pas d'image fluorescente sur les neurones, tandis qu'avec le contrôle positif on obtient une fluorescence 2+ ou supérieure.

Dans le cas où les contrôles ne donnent pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à :

- La turbidité. Eliminer le contrôle et en utiliser un nouveau.
- Au système optique du microscope. Par exemple: mauvais alignement, lampe ayant dépassé sa durée de vie, etc.
- A un assèchement des lames pendant la manipulation.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Des résultats de l'essai pour des anticorps anti-neuronal devraient être rapportés en tant que négatifs (< 10) ou positif avec le titre. La spécificité de la réaction d'anticorps est déterminée en tableau 1 et schémas 1 et 2 a la fin de ces document.

LIMITES D'UTILISATION

Dans certains cas, les sérums positifs pour des anticorps de anti-neuronal peuvent être très faibles ou négatif à la dilution initiale de criblage (phénomène de prozone). Dans de tels cas douteux les sérums devraient être essayés de nouveau à des dilutions plus élevées et, si positif, à des titres d'anticorps déterminés.

La présence de deux anticorps ou plus dans un sérum réagissant avec le substrat peut causer une interférence dans leur détection par l'immunofluorescence et peut causer un manque de détecter des anticorps de anti-neuronal ou une suppression du titre. Dans ces cas-ci, des essais ont pu être réalisés par Western Immunoblotting. On lui recommande que tous les échantillons positifs soient confirmés pour la spécificité d'anticorps par des techniques d'immunoblot.

VALEURS

Il y a une association forte parmi *des syndromes paraneoplastique*, des spécificités d'anticorps de anti-neuronal et le type associé de tumeur. Cependant, dans une minorité de patients présentant le syndrome paraneoplastique avec des anticorps de anti-neuronal, aucune tumeur ne peut être trouvée. Certains patients présentant *des syndromes paraneoplastique* peuvent ne pas avoir les niveaux discernables (par IFA) des anticorps de anti-neuronal. La plupart des cas qui développent PCD en association avec la maladie de Hodgkin, non-SCLC, carcinomes gastro-intestinaux, n'ont pas les anticorps démontrable de anti-Yo. Là existent également négatif de anti-Yo mais autoanticorps atypiques de cytoplasme de cellules de anti-purkinje (APCA's atypique). De tels anticorps peuvent se produire en association avec la maladie de Hodgkin, *l'adénocarcinome* du poumon, les deux points, ou la prostate¹⁰. 5-6% patients avec le cancer ovarien ont les anticorps de circulation de anti-Yo ou de anti-Ri en l'absence de syndromes neurologiques paraneoplastique¹¹. La table 2 à la fin de ce document signifie l'utilité des essais d'anticorps pour des anticorps de anti-neuronal.



ImmuGlo™

Anti-Neuronal Anticuerpo IFA

IVD

REF

Code 1111

48 determinaciones

Una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la detección y la semi-cuantificación de autoanticuerpos anti-neuronales (*paraneoplástico*), anti-Yo, anti-Hu y anti-Ri, en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las respuestas autoinmunes del sistema nervioso central (CNS), reconocidas como *desórdenes neurológicos paraneoplásticos* son manifestaciones de una inmunorrespuesta anti-tumor. Éstos consisten en una variedad de desórdenes neurológicos como *el encefalomielite paraneoplástico (PE)*, *la neuropatía sensorial paraneoplástico (PSN)*, *la degeneración cerebelosa (PCD)*, *la ataxia paraneoplástico del myoclonus opsoclonus (POMA)* y *el síndrome de Stiffmann*¹⁻³. La diagnosis confiable de tales condiciones y detección del tumor subyacente es difícil. En un número significativo de casos en hecho, el tumor subyacente no se descubre hasta que el paciente presenta con los síntomas neurológicos^{4,5}. *Los desórdenes paraneoplásticos* son caracterizados por la presencia de autoanticuerpos neuronales en suero paciente. La detección de estos autoanticuerpos es útil para el clínico pues representa la presencia de un tumor subyacente. Los tumores que se han sabido para iniciar desórdenes paraneoplásticos *del cáncer de pulmón de la pequeño-celula, del neuroblastoma, del pecho, ováricos y testiculares*. Los autoanticuerpos siguientes se encuentran en *síndromes paraneoplásticos*⁶⁻⁸.

- a) **Anti-Hu, anticuerpo anti-nuclear neuronal de tipo I (ANNA-1) se asocia al cáncer de pulmón de la pequeño-celula dando por resultado el PE.**
- b) **Anti-Yo, anticuerpos de la célula del anti-purkinjee (PCA-1) se asocia a carcinomas ováricos y del pecho dando por resultado PCD.**
- c) **Anti-Ri, anticuerpo anti-nuclear neuronal de tipo II (ANNA-2) se asocia al cáncer de Neuroblastoma (niños) y de falopio o de pecho dando por resultado POMA.**

La presencia de uno de estos anticuerpos apoya la diagnosis clínica *del síndrome paraneoplástico* y conduce a una búsqueda enfocada para el neoplasma subyacente. Estos marcadores también ayudan en discriminar entre los desórdenes paraneoplásticos verdaderos y otros desórdenes inflamatorios del sistema nervioso que mímico un síndrome paraneoplástico.

La inmunofluorescencia indirecta proporciona un método sensible de detectar estos autoanticuerpos. Los autoanticuerpos de anti-Hu/anti-Ri, que característico manchan el núcleo granular de la célula, se distinguen fácilmente del citoplasma de la célula de Purkinje que mancha los anticuerpos del anti-Yo. Sin embargo, para facilitar la distinción entre los autoanticuerpos de Hu y de Ri hemos diseñado un sustrato triple. Esta presentación del sustrato del triple también identifica y elimina los anticuerpos antinucleares

de la investigación específica de los autoanticuerpos paraneoplásticos. Si el espécimen no rinde ningún inmunoreactivación por inmunofluorescencia el resultado se divulga como negativa. La especificidad de esos positivo resuelto de IFA se podía entonces confirmar por el método de Western immunoblot.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Anticuerpos a Hu (ANNA 1), Yo1 (Pca-1), y Ri (ANNA2) son detectados por inmunofluorescencia indirecta usando un compuesto del sustrato de secciones del cerebelo del mono, de la tripa del roedor y del hígado. En este método de IFA, los sueros de los pacientes se incuban en las secciones para permitir atar a los anticuerpos a los antígenos específicos del sustrato. Cualquier inmunoglobulina y otras proteínas del suero no limitadas a las secciones del tejido fino son quitadas aclarando. Los anticuerpos enlazados de la clase de IgG son detectados por la incubación del sustrato con el conjugado FITC de IgG. Las reacciones se observan debajo de un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros apropiados. La presencia de anticuerpos de una especificidad es determinada por sus reacciones específicas a las células cerebelosas de las neuronas (Purkinje, molecular o granular) y las neuronas del plexo mienterios en la tripa.

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

Almacenamiento y preparación

Almacenar todos los reactivos a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos pueden emplearse después de haber sido equilibrados a temperatura ambiente.

Materiales Suministrados

ImmuGlo™ anti-Neuronal IFA **REF** 1111

El kit contiene los suficientes reactivos para realizar 48 determinaciones.

8x	SORB SLD 6	Portaobjetos de 6 pocillos con sustrato del cerebelo-roedor intestino/ hígado del primate
1 x 0,5 ml	CONTROL + NEURONAL *	Control positivo de anti-neuronal anticuerpo , suero humano con BSA
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Control negativo , suero humano con BSA
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB *	Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgG anti humana con BSA. Proteger de la luz
1 x 60 ml	BUF *	Diluyente de la muestra con BSA
2 viales	BUF WASH	Fosfato salino tamponado (PBS) . Disolver cada vial en 1 litro
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Medio de preparación . No congelar
1 x 12	COVER SLD	Cubreobjetos

* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN₃

Materias opcionales comercializados

1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgG anti humana con BSA. Proteger de la luz (2099X)
1 x 1,0 ml	EVANS	Colorante de contraste azul de Evans (2510)

Material necesario, pero no suministrado

Microscopio de fluorescencia
Micropipetas o pipeta Pasteur
Pipetas serológicas
Placa de tinción (por ejemplo, frasco de Coplin)
Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo, 13 x 75 mm) y gradilla de tubos de ensayo
Agua destilada o desionizada
Envase de 1 litro
Frasco de lavado
Toallas de papel
Cámara de incubación

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*. Todos los componentes de derivados sanguíneos humanos han sido ensayados respecto a la presencia de HbsAg, VHC, VIH-1 y 2 y el virus linfotrofo de células T humanas (VLTH-I), siendo negativos en los ensayos necesarios según la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos). Todas las muestras de suero y los derivados sanguíneos humanos deben tratarse como un material potencialmente peligroso, independientemente de su origen. En consecuencia, deben seguirse unas prácticas de laboratorio adecuadas durante el almacenamiento, dispensación y eliminación de dicho material⁹.

PRECAUCIÓN - La azida sódica (NaN_3) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas muy explosivas. Después y desechar los líquidos, es necesario lavar con un volumen grande de agua para evitar la acumulación de azida. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere. En caso de ingestión, notificarlo inmediatamente al director del laboratorio o al centro toxicológico.

Para poder garantizar la obtención de resultados válidos, deben seguirse de forma exacta las instrucciones indicadas en este prospecto. No intercambiar componentes del equipo por otros diferentes que no tengan el mismo número de catálogo de IMMCO. No utilizar este equipo después de la fecha de caducidad.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la realización de esta determinación sólo debe utilizarse suero. Las muestras con hemólisis macroscópica, lipémicas o contaminadas por microorganismos pueden interferir en el funcionamiento del ensayo y, por tanto, no deben ser utilizadas. Almacenar las muestras a una temperatura de 2-8°C durante un período no superior a una semana. Cuando se desee un almacenamiento más prolongado, el suero debe congelarse a una temperatura de -20°C. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PROCEDIMIENTO

Método de ensayo

A. Detección sistemática

1. Diluir 1:10 el suero de cada paciente con el diluyente de la muestra suministrado (0,1 ml de suero + 0,9 ml del diluyente). No diluir los Controles Positivo o Negativo. Guardar el suero no diluido para la determinación del título de anticuerpos si los resultados son positivos.
2. Permitir que los pocillos de los portaobjetos que contienen el substrato se equilibren a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraer con cuidado los portaobjetos sin tocar el substrato.
3. Etiquetar los portaobjetos y colocarlos en una cámara de incubación cubierta con toallas de papel humedecidas con agua para evitar la desecación.
4. Invertir el vial cuentagotas y presionar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) del Control Negativo en el pocillo nº 1. De forma similar, aplicar una gota del Control Positivo en el pocillo nº 2. Evitar llenar demasiado los pocillos.
5. Con el empleo de una micropipeta o una pipeta Pasteur, colocar 1 gota del suero diluido del paciente (aproximadamente 50 µl) en los restantes pocillos. Evitar llenar demasiado los pocillos.
6. Tapar la cámara de incubación e incubar los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Quitar la tapa de la cámara de incubación. Coger el portaobjetos por el extremo y lavar suavemente con 10 ml de PBS mediante el empleo de una pipeta o lavar el portaobjetos en un vaso de precipitado lleno de PBS. No emplear un frasco de lavado. Transferir inmediatamente el portaobjetos al frasco de Coplin y dejarlo durante 10 minutos. Repetir el proceso con todos los portaobjetos restantes.
8. Extraer el portaobjetos del frasco de Coplin. Secar el extremo del portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Colocar el portaobjetos en la cámara de incubación, Invertir inmediatamente el vial cuentagotas del Conjugado y apretar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) en cada pocillo.
9. Repetir las etapas 7 y 8 con cada portaobjetos.
10. Tapar la cámara de incubación. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraer el portaobjetos del incubador. Sumergir el portaobjetos en un vaso de precipitado con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Colocar el portaobjetos en una cubeta de tinción llena con PBS durante 10 minutos. Al final del lavado puede añadirse, si se desea, 2-3 gotas de colorante de contraste azul de Evans. Repetir el proceso con los portaobjetos restantes.
12. Extraer el portaobjetos de la cubeta de tinción. Secar el portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Para evitar que se seque el portaobjetos, realizar inmediatamente, mientras el portaobjetos todavía está húmedo, el proceso descrito en el apartado 13.
13. Añadir 3 gota del Medio de Preparación uniformemente en cubreobjetos y colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos. Evitar la aplicación de una presión excesiva y el movimiento lateral del cubreobjetos.
14. Repetir las etapas 12 y 13 con cada portaobjetos.
15. Examinar el desarrollo de fluorescencia específica en un microscopio de fluorescencia a 200x o más aumentos.

Los portaobjetos pueden leerse al terminar su preparación. Sin embargo, debido a que el medio de preparación contiene un agente antidesfocamiento, puede retrasarse la lectura durante un período de hasta 48 horas sin que se produzca una pérdida significativa de la intensidad de la tinción. Los portaobjetos deben almacenarse en la oscuridad a una temperatura de 2-8°C.


B. Determinación del punto de valoración (titulación)

Los sueros positivos durante el ensayo pueden valorarse de forma adicional, etapas 6 - 15, para determinar su titulación. Cada ensayo debe incluir un control positivo y negativo. Realizar diluciones seriadas dobles a partir de 1:10. El título es el valor recíproco de la dilución más elevada que produzca una reacción positiva.

Preparación de las diluciones seriadas

Numerar cuatro tubos del 1 al 4. Añadir 1,0 ml del diluyente de la muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 4. Pipetear 0,05 ml del suero no diluido en el tubo 1 y mezclar minuciosamente. Transferir 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezclar meticulosamente. Continuar transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente tras la mezcla y, de este modo, conseguir las diluciones ilustradas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4	5	6
Suero	0.1 ml					
	+					
Diluyente tamponado	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Transferencia		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Dilución final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.



CONTROL DE CALIDAD

En cada serie de ensayos debe incluirse un control positivo y negativo. El control negativo no debe mostrar fluorescencia específica de la neurónios se lía; por el contrario, el control positivo debe tener una intensidad de tinción igual o superior a 1+.

Cuando no se obtienen los resultados esperados, debe repetirse el ensayo. Los resultados anómalos con los controles pueden producirse por:

- Turbidez. Desechar y utilizar otro control.
- Problemas del sistema óptico del microscopio de fluorescencia. Estos problemas pueden incluir un alineamiento inadecuado, una lámpara con fecha posterior a la esperanza de vida útil, etc.
- Secado del portaobjetos durante el procedimiento.

RESULTADOS

Los resultados de la prueba para los anticuerpos anti-neuronales se deben divulgar como negativos (< 10) o positivo con título. La especificidad de la reacción del anticuerpo se determina en tabla 1 y cuadros 1 y 2 en el extremo de este documento.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunas cajas, los sueros positivos para los anticuerpos anti-neuronales pueden ser muy débiles o negativa en la dilución inicial de la investigación (fenómeno del prozone). En tales casos dudosos los sueros se deben reexaminar en diluciones más altas y, si positivo, títulos del anticuerpo determinados.

La presencia de dos o más anticuerpos en un suero que reacciona con el sustrato puede causar una interferencia en su detección por inmunofluorescencia y puede causar una falta de detectar anticuerpos anti-neuronales o una supresión del título. En tales casos, las pruebas se podían realizar por Western Immunoblotting. Se recomienda que todas las muestras positivas sean confirmadas para la especificidad del anticuerpo por técnicas del inmunoblot.

VALORES PREVISTOS

Hay una asociación fuerte entre *síndromes paraneoplásticos*, las especificidades del anticuerpo anti-neuronales y el tipo asociado del tumor. Sin embargo, en una minoría de pacientes con síndrome paraneoplástico con los anticuerpos anti-neuronales, ningún tumor no puede ser encontrado. Ciertos pacientes con *síndromes paraneoplásticos* pueden no tener niveles perceptibles (por IFA) de anticuerpos anti-neuronales. La mayoría de los casos que desarrollan PCD en la asociación con la enfermedad de Hodgkin, non-SCLC, carcinomas gastrointestinales, no tienen anticuerpos demostrable del anti-Yo. También existen negativa del anti-Yo pero los autoanticuerpos anormales del citoplasma de la célula del anti-Purkinje (APCA's anormal). Tales anticuerpos pueden ocurrir en la asociación con la enfermedad de Hodgkin, el *adenocarcinoma* del pulmón, los dos puntos, o la próstata ¹⁰. 5-6% pacientes con el cáncer ovárico tienen anticuerpos del anti-Yo que circulan o del anti-Ri en ausencia de cualquier síndrome neurológico paraneoplástico ¹¹. La tabla 2 en el extremo de este documento siguiente significa la utilidad de las pruebas del anticuerpo para los anticuerpos anti-neuronales.

REFERENCES • REFERENCIAS • LITERATUR • RIFERIMENTI

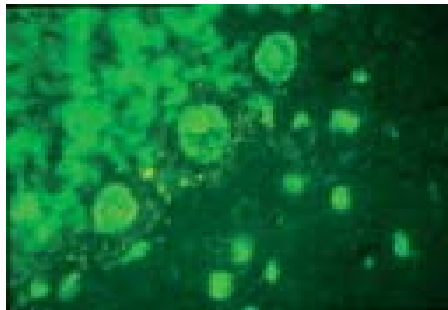
1. Posner, JB. Paraneoplastic syndromes. *Neuro Clinics*; 9:919-936, 1991.
2. Dalmau JO, Posner JB. Paraneoplastic syndromes. *Arch Neurol*; 56: 405-408, 1999.
3. Dropcho EJ. Principles of Paraneoplastic syndromes. *Ann NY Acad Sci*; 841:246-261, 1998.
4. Moll JWB, Henzen-Logmans SC, Splinter TAW et 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. Dropcho EJ. Autoimmune central nervous system paraneoplastic disorders: Mechanisms, diagnosis, and therapeutic options. *Ann. Neurol*; 37:S102-S113, 1995.
11. Drlicek M, Bianchi G, Boglium G, et. al. Antibodies of the anti-Yo and anti-Ri type in the absence of paraneoplastic neurological syndromes: a long term survey of ovarian cancer patients. *J. Neurol*; 244: 85-89, 1997.
12. Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK and Posner JB. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine*; 71:59-72, 1992.
13. Greenlee JE, Brashear HR. Antibodies to cerebellar purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinoma. *Ann Neurol*; 14:609-613, 1983.
14. Altermatt HJ, Rodriguez M, Scheithauer BW and Lennon VA. Paraneoplastic anti-purkinje and type I anti-neuronal nuclear autoantibodies bind selectively to central, peripheral, and autonomic nervous system cells. *Lab Invest*; 65:412-420, 1991.
15. Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, et al. Anti-Ri: An antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Ann Neurol*; 29:241-251, 1991.

Table 1: Immunofluorescent Reaction Pattern Identification

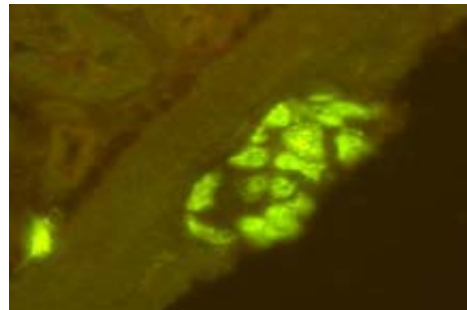
Antibody Specificity	Cerebellar Purkinje	Neurons Granular	Gut Myenteric Plexus	Liver
Hu (ANNA-1)	Nucleus + Nucleolus - Cytoplasm +	Nucleus + Nucleolus - Cytoplasm +	Nucleus + Nucleolus - Cytoplasm +	-
Ri (ANNA-2)	Nucleus - Nucleolus - Cytoplasm -	Nucleus + Nucleolus - Cytoplasm +	Nucleus - Nucleolus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

- = Negative; + = Positive

Fig. 1: Hu (ANNA-1) Antibody

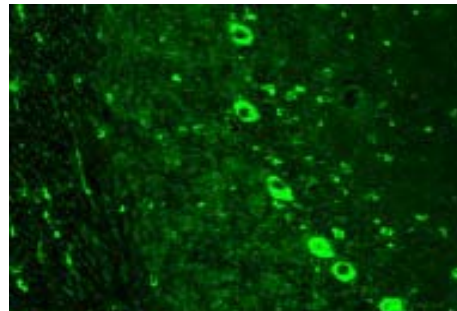


Indirect IF on primate cerebellum - staining of nuclei and cytoplasm of Purkinje and granular layer cells.



Indirect IF on rodent gut myenteric plexus

Fig. 2: Yo (PCA-1) Antibody



Indirect IF on primate cerebellum - staining of cytoplasm only.

Table 2: Clinical Significance of Paraneoplastic anti-Neuronal Antibodies¹²⁻¹⁵

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

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 Group, Inc.
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com

REV.MAR2011

Document No. PI4111 CE