

ALPHADOTS GANGLIOSIDES PROFILE

PROFILE IgG and/or IgM
Code : AD GANG12 – 12 tests

PROFILE IgG + IgM
Code : AD GANGS12 – 12 tests
AD GANGS24 – 24 tests

DEUTSCH (D)

ENGLISH (GB)

ESPAÑOL (ES)

ΕΛΛΗΝΙΚΑ (GR)

FRANÇAIS (F)

ITALIANO (I)

NEDERLANDS (NL)

PORTUGES (PT)

ALPHADIA SA/NV
Avenue Vésale 26
1300 Wavre - Belgium
Tel : +32(0)10 24 26 49
Fax : +32(0)10 24 55 99
Email : contact@alphadia.be

ISO15223	Symbole für Medizinprodukte	MEDICAL DEVICES SYMBOL	SÍMBOLOS PARA PRODUCTOS SANITARIOS	ΣΥΜΒΟΛΟ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΣΥΣΚΕΥΩΝ	SYMBOLES APPLIQUES AUX DISPOSITIFS MEDICAUX	SIMBOLO DEI DISPOSITIVI MEDICALI	SYMBOL MEDISCHE HULPMIDDELEN	SÍMBOLOS DE DISPOSITIVO MEDICO
	Limitierung der Lagertemperatur	Storage temperature limitation	Limitación de temperatura de almacenamiento	Περιορισμός θερμοκρασίας φύλαξης	Limites de températures	Limite temperatura di conservazione	Temperatuurlimiet	Limite da temperatura de armazenagem
LOT	Chargencode	Batch code	Código de lote	Κωδικός παρτίδας	Numéro de lot	Codice lotto	Lot nummer	Lote
	Verwendbar bis	Use by	Consumir antes de	Ημερομ. λήξης	Date d'expiration	Utilizzato da	Houdbaar tot	Utilizado por
	Das Handbuch zu Rate ziehen	Consult operating instructions	Consultar las instrucciones de manejo o funcionamiento	Ανατρέξετε στις οδηγίες λειτουργίας	Lire les instructions	Consultare le istruzioni di funzionamento	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Consulte o manual de operações
IVD	Für in-vitro-diagnostische Anwendung	In vitro diagnostic device	Dispositivo de diagnóstico <i>In vitro</i>	Διαγνωστική συσκευή <i>in vitro</i>	<i>in vitro</i> diagnostic	Dispositivo per diagnostica <i>In vitro</i>	Medisch hulpmiddel voor <i>in-vitro</i> diagnostiek	Dispositivo de diagnóstico <i>In vitro</i>
	Hergestellt von	Manufactured by	Fabricado por	Κατασκευάζεται από την	Fabriqué par	Fabbricato da	Fabrikant	Fabricado por
REF	Katalog Nr.	Catalogue number	Número de catálogo	Αριθμός καταλόγου	Référence	Numero catalogo	Catalogus nummer	Número do catalogo

	SYMBOLE (empfohlen von der EDMA)	SYMBOLS (EDMA recommendations)	SÍMBOLOS (recomendaciones de la EDMA)	ΣΥΜΒΟΛΑ (Συστάσεις EDMA)	SYMBOLES (recommandations EDMA)	SIMBOLI (raccomandazioni EDMA)	SYMBOLEN (EDMA-aanbevelingen)	SÍMBOLOS (EDMA recomendações)
	Anzahl der Bestimmungen	Number of determinations	Número de determinaciones	Αριθμός προσδιορισμών	Nombre de déterminations	Numero di determinazioni	Inhoud voldoende voor "n" tests	Número de determinações
CONTROL +	Positivkontrolle	Positive control	Control positivo	Θετικός ορός ελέγχου	Contrôle positif	Controllo positivo	Positieve controle	Controle positivo
SORB STP	Beschichtete Streifen	Coated Strips	Tiras de filtro recubiertas	Επιστρωμένες οειρές	Bandelettes recouvertes d'antigènes	Strisce ricoperte	Gecoate strips	Tiras adsorvidas
IgG-CONJ HRP	IgG HRP-Konjugat	IgG HRP conjugate	Conjugado HRP IgG	Αντιδραστήριο συζευγμένο με IgG HRP	Conjugué HRP pour IgG	Coniugato HRP IgG	IgG HRP-conjugaat	conjugado HRP IgG
IgM-CONJ HRP	IgM HRP-Konjugat	IgM HRP conjugate	Conjugado HRP IgM	Αντιδραστήριο συζευγμένο με IgM HRP	Conjugué HRP pour IgM	Coniugato HRP IgM	IgM HRP-conjugaat	conjugado HRP IgM
IgG+M-CONJ HRP	Ig (G+M) HRP-Konjugat	Ig (G+M) HRP conjugate	Conjugado HRP Ig (G+M)	Αντιδραστήριο συζευγμένο με Ig (G+M) HRP	Conjugué HRP pour Ig (G+M)	Coniugato HRP Ig (G+M)	Ig (G+M) HRP-conjugaat	conjugado HRP Ig (G+M)
DIL	Probenverdünnungspuffer	Sample Diluent	Diluyente de muestra	Αραιωτικό δείγματος	Diluant des échantillons	Diluyente campione	Verduunningsvloeistof voor monster(s)	Diluyente da amostra
SUBS TMB	Substratlösung	Substrate solution	Solución de sustrato	Διάλυμα υποστρώματος	Solution du substrat	Soluzione di substrato	Substraatoplossing	Solução substrato
BUF WASH n X	Waschlösung zum n-maligen verdünnen	Wash solution to be diluted n-fold	Solución de lavado que debe diluirse n veces	Διάλυμα πλύσης προς αραίωση n-φορές	Solution de lavage concentrée n fois	Soluzione di lavaggio da diluire in n volte	In n-voud te verdunnen wasoplossing	Solução de lavagem a ser diluída n-vezes

DEUTSCH

IMMUNODOT ASSAY ZUR BESTIMMUNG VON hlgG & hlgM ODER hlg (G+M) AUTOANTIKÖRPERN GEGEN GANGLIOSIDE IN HUMANEM SERUM.

AD-GANG12, AD-GANGS12 12 Bestimmungen
AD-GANGS-24 24 Bestimmungen

NUR FÜR ZWECKE DER IN-VITRO-DIAGNOSE BESTIMMT

1. KLINISCHE ANWENDUNG

Ganglioside

Ganglioside sind eine Sialinsäure, die Glykosphingolipide enthält. Diese setzen sich zusammen aus einem langkettigen aliphatischen Amin (Ceramid) und einer bis fünf angehängten Hexosen, von denen mindestens eine sialyliert sein muß. Das Vorhandensein eines Sialinsäuremoleküls (oder mehrerer), gebunden an einen Galaktoserest im Innern der Hexose, definiert das Glykosphingolipid als Gangliosid (1).

Gangliosiden werden in der äußeren Schicht der Plasmamembran lokalisiert und sind reichlich im Myelinmantel der Schwann-Zellen (peripheres Nervensystem) und in den Oligodendrozyten (zentrales Nervensystem) (2) vorhanden.

Neuropathie und Anti-Glykokonjugat Autoantikörper

Das erste klinische Syndrom, bei dem Anti-Glykokonjugat Autoantikörper beschrieben wurden, war die paraproteinämische Neuropathie assoziiert mit Anti-MAG Autoantikörpern (1). Weitere Untersuchungen offenbarten die Nähe von peripheren Neuropathien und Anti-Glykolipid Autoantikörpern so wie Anti-Ganglioside oder Anti-MAG bei einer großen Anzahl peripherer neuropathischer Zustände (2-6). Eine anfängliche Skepsis gegenüber der Signifikanz von Anti-Glykolipid Autoantikörpern wich der Erkenntnis, dass diese Autoantikörper direkt zur Pathogenese der Neuropathie beitragen können.

GANGLIO Ab PROFILE		
SULFATIDE	→	SENSORISCH DEMYELINISIERENDE POLYNEUROPATHIE (IgM)
GQ1b	→	MILLER-FISHER SYNDROM (IgG)
GT1b	→	CANOMAD (IgM)
GT1a	→	ZERVICO-BRACHIALES GBS (IgG)
GD3	→	ATAXISCH SENSORISCHE NEUROPATHIE - AKUT (IgG) - CHRONISCH (IgM)
GD1b	→	
GD1a	→	MOTORISCHE NEUROPATHIE (IgM)
GM3	→	CANOMAD (IgM)
GM2	→	CIDP (IgG)
GM1	→	MULTIFOKALE MOTORISCHE NEUROPATHIE (IgM) AXONALE FORM DES GBS (AMAN) (IgG)
Funct Control		

2. VERSUCHSPRINZIP

Der ALPHADIA Ganglioprofile kit ist ein qualitativer in-vitro assay für humane Autoantikörper (IgG, IgM or Ig G+M) gegen zehn spezifische Ganglioside: Sulfatide, GQ1b, GT1b, GT1a, GD3, GD1b, GD1a, GM3, GM2 and GM1.

Während der ersten Inkubationszeit reagieren die spezifischen Autoantikörper, die in dem verdünnten Serum enthalten sind, mit den Gangliosid-Dots der Membranstreifen. Danach werden die Streifen gewaschen, um ungebundene Antikörper und andere Serumbestandteile zu entfernen. In einer zweiten Inkubationszeit wird ein an ein HRP gebundener Anti-humane Antikörper in die Wanne hinzugefügt und reagiert mit dem auf den Membranstreifen gebundenen humanen IgG und IgM Antikörper. Nach einem erneuten Waschschrift, bei dem das ungebundene Konjugat entfernt wird, werden spezifische Antikörper durch Inkubation mit einer Substratlösung nachweisbar.

3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- Beschichtete Streifen** : 12 oder 24 mit Gangliosid-Antigenen beschichtete Membranstreifen. Unbenutzte Membranstreifen können bei 4°C, geschützt vor Feuchtigkeit in einem Antikondensationsbeutel aufbewahrt werden.
- Positivkontrolle** : 1 Mikroröhrchen (30µl) mit positivem Serum
Konservierungsmittel : NaN₃ (<0,1%)
- Enzymkonjugat** : 1 oder 2 Fläschchen (10 ml) mit:
 - Anti-hlgG gebunden an Meerrettichperoxidase (HRPO), für AD-GANG12
 - Anti-hlgM gebunden an Meerrettichperoxidase (HRPO), für AD-GANG12
 - Anti-hlg (G+M) gebunden an Meerrettichperoxidase (HRPO), für AD-GANGS12 and AD-GANGS24
 Konservierungsmittel : Neomycin. Gebrauchsfertig.
- Probenverdünnungspuffer** : 1 oder 2 Fläschchen (32,5 ml) mit .
Konservierungsmittel : NaN₃ (<0,1%). Gebrauchsfertig.
- Waschpuffer** : 1 Fläschchen (40 ml) Phosphatpuffer mit Detergent.
Konservierungsmittel: Thimerosal (<0,1%). Füllen sie den Inhalt des Fläschchens mit Aqua dest. bis auf 400 ml (finales Volumen) auf. Bei 4°C bleibt die verdünnte Waschlösung einen Monat lang stabil.
- Substratlösung** : 1 oder 2 Fläschchen (10ml) mitTetramethylbenzidin. Gebrauchsfertig.
- Inkubationsplatte**: 1 oder 2 x 12 Wann

4. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Justierbare, automatische Mikropipette mit Einmalpipettenspitzen
- Graduierter Zylinder
- Absaugpumpe
- Aqua dest.
- Wippschüttler

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Um Kontaminationen von Personal und Umwelt zu vermeiden, müssen folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- Benutzen sie Einmalhandschuhe beim Arbeiten mit potentiell infektiösem Material und während der Assaydurchführung.
- Pipettieren sie nicht mit dem Mund.
- Rauchen, essen, trinken sie nicht und benutzen sie keine Kosmetika während der Assaydurchführung
- Das Chromogen muss vorsichtig gehandhabt werden. Vermeiden sie den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten. Im Falle eines Unfalls gründlich unter fließendem Wasser ausspülen.
- Alle Materialien humaner Herkunft zur Herstellung dieses Kits sind negativ auf HBs-Ag, Anti-HIV und Anti-HCV getestet. Da jedoch keine der zur Zeit verfügbaren Testmethoden absolute Gewähr für das Fehlen dieser Viren garantieren kann, müssen alle Proben und Reagenzien als potentiell infektiös betrachtet werden ; deshalb muss der Assayabfall dekontaminiert und beseitigt werden in Übereinstimmung mit den etablierten Sicherheitsstandards.

Vorhandene entzündbare Materialien müssen verbrannt werden; nicht entzündbare Materialien müssen im Autoklaven mindestens 1 Stunde bei 121 °C sterilisiert werden.

- Flüssigem Abfall muss Natriumhypochlorit zugefügt werden, um eine Endkonzentration von 3% zu erhalten. Diese muss mindestens 30 Min. einwirken. Flüssiger säurehaltiger Abfall muss zunächst mit einer geeigneten Menge an Base neutralisiert werden, bevor er mit Natriumhypochlorit versetzt werden kann.
- Vermeiden sie Spritzen und Aerosolbildung. Für den Fall einer Kontamination durch Spritzer reinigen sie sorgfältig mit 3% iger Natriumhypochloritlösung und entsorgen diese Reinigungsflüssigkeit als potentiell infektiösen Abfall.
- Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel; um den Aufbau von explosiven Metallaziden in Rohr- und Kupferleitungen zu verhindern, müssen die Reagenzien unter großen Mengen fließenden Wassers entsorgt werden.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen folgende Regeln beachtet werden.

- Mischen Sie keine Reagenzien verschiedener Chargennummern oder anderer Hersteller.
- Die strikte Einhaltung der festgelegten Inkubationszeiten und Temperaturen ist zu empfehlen, um korrekte Ergebnisse zu erhalten.
- **Bringen sie die Membranstreifen auf Raumtemperatur bevor sie das gelagerte Röhrchen öffnen.**
- **Bringen sie die Reagenzien vor Gebrauch nicht auf Raumtemperatur, diese müssen bei 4°C aufbewahrt werden.**
- Benutzen sie die Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Unvollständiges oder unwirksames Waschen ist der Grund von Ungenauigkeiten und hohem Hintergrund.
- Benutzen sie ausschließlich saubere Glassachen, frei von Kontaminationen mit Metallionen oder oxidierenden Substanzen.
- Benutzen sie destilliertes Wasser (Aqua dest.), welches in sauberen Behältern aufbewahrt wird.
- Vermeiden sie Kontaminationen zwischen den Proben. Benutzen sie für jedes Reagenz und für jede Probe eine neue Einmalpipettenspitze.
- Mit Mikroben verunreinigtes Serum oder Proben, die stark sichtbare Partikel enthalten, sollten nicht benutzt werden.
- Kontaminationen zwischen den Reagenzien oder Proben führen zu falschen Ergebnissen. Benutzen sie frische Einmalpipettenspitzen für jedes Reagenz und jede Probe.
- Während der Lagerung oder der Inkubation darf das Substrat keinem Licht ausgesetzt werden.
- Befolgen sie exakt die Inkubationszeiten.
- Eine Vielzahl von Faktoren beeinflussen die Assaydurchführung. Dies schließt die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Pipettierens ein, sowie den Gebrauch des Photometers und den zeitlichen Ablauf während der Assaydurchführung.
- **Nur getrocknete Membranstreifen sollten evaluiert werden.**

6. SAMMLUNG VON EINZELPROBEN

Es ist empfehlenswert Serum zu benutzen. Stark lipämische und hämolytische Proben müssen verworfen werden. Die Proben können einen Tag bei 2-8°C aufbewahrt werden, für einen längeren Zeitraum ist es ratsam die Proben aliquotiert bei -20 °C einzufrieren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden.

7. TESTVERLAUF

VORSICHT :

INKUBATIONEN MIT SERUM UND KONJUGAT MÜSSEN BEI 4°C DURCHGEFÜHRT WERDEN:

Um Kondensation auf den Streifen vorzubeugen, öffnen sie die Röhrchen mit der Membran erst, wenn die Streifen auf Raumtemperatur sind.

Probe(n) und Kontrollvorverdünnung : 1:101

- Bereiten sie die Vorverdünnungsröhrchen für Probe(n) und Kontrolle vor.
- Geben sie 500 µl des Probenverdünnungspuffers zu
- Pipettieren sie 5 µl der Probe(n) und Kontrolle
- Mischen sie die Röhrchen

Versuchsdurchführung

- Pipettieren sie 1ml der Probenverdünnung, füllen sie jede Wanne, die Streifen enthält, und inkubieren sie 10 min **bei 4°C** auf einem Wippschüttler.
- Pipettieren sie 250 µl vorverdünnter Proben und Kontrolle und fügen sie sie der spezifischen Wanne zu
- Inkubieren sie 120 min **bei 4°C** auf einem Wippschüttler
- Entfernen oder saugen sie die Flüssigkeit aus jeder Wanne ab
- Waschen sie die Membranstreifen 3 mal je 5 min **bei 4°C** mit 1 ml verdünnter Waschlösung
- Entfernen oder saugen sie die Flüssigkeit aus jeder Wanne ab
- Fügen sie 750µl des Spezifischen Enzym Konjugats in die Inkubationswanne hinzu
- Inkubieren sie 60 min bei **4°C** auf einem Wippschüttler
- Entfernen oder saugen sie die Flüssigkeit aus jeder Wanne ab
- Waschen sie die Membranstreifen 3 mal je 5 min mit 1 ml verdünnter Waschlösung
- Waschen sie die Membranstreifen mit 1 ml deionisiertem Wasser
- Entfernen oder saugen sie die Flüssigkeit aus jeder Wanne ab
- Fügen sie 750µl der Chromogensubstratlösung in die Inkubationswanne zu
- Inkubieren sie 10 min. bei RT auf einem Wippschüttler
- Entfernen oder saugen sie die Flüssigkeit aus jeder Wanne ab
- Stoppen sie die Reaktion mit 2 ml deionisiertem Wasser
- Inkubieren sie 5 min bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler.
- Entfernen sie die Streifen aus den Wann
- Lassen sie die Streifen 30 min an der Luft trocknen und lesen .
- Fixieren sie die Teststreifen auf dem Evaluierungsprotokoll.

8. PIPETTIERSHEMA

Inkubationswanne	Kontrolle	Probe(n)
Beschichteter Streifen	1	1
Probenverdünnung	1000 µl	1000 µl
- Inkubieren : 10 min bei 4°C auf einem Wippschüttler		
Vorverdünnte Probe(n)	----	250 µl
Vorverdünnte Positivkontrolle	250 µl	----
- Inkubieren : 120 min bei 4°C auf einem Wippschüttler		
- Absaugen und waschen : 3 x 1000 µl: 5 min bei 4°C		
HRPO-Konjugat	750 µl	750 µl
- Inkubieren : 60 min bei 4°C auf einem Wippschüttler		
- Absaugen und waschen : 3 x 1000 µl verdünnter		
- Waschlösung: 5 min bei 4°C		
- Absaugen und waschen : 1 x 1000 µl deionisiertem Wasser : 5 min bei 4°C		

Inkubationswanne	Kontrolle	Probe(n)
Substratlösung	750 µl	750 µl
<ul style="list-style-type: none"> - Inkubieren : 10 min bei RT auf einem Wippschüttler - Absaugen der Lösung 		
Deionisiertes Wasser	2000 µl	2000 µl
<ul style="list-style-type: none"> - Inkubieren sie 5 min bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler. - An der Luft trocknen - Lesen nach 30 min 		

9. INTERPRETATION DER RESULTATE

ALPHADOTS Interpretation der Teststreifen

Die Interpretation der Resultate beruht auf der visuellen Untersuchung:

- Tritt keine Verfärbung der Membran auf (wobei die Funktionskontrolle reagiert) muss dies als negatives Resultat betrachtet werden.
- Das Auftreten eines oder verschiedener farbiger Punkte auf der Membran (blaue Ablagerung verschiedener Intensität als Reaktion) muss als positives Resultat betrachtet werden (+/++/+++).

Die Intensität der Dot-Reaktion ist direkt proportional zur Anzahl der im Serum vorhandenen spezifischen Autoantikörper. Mit ansteigendem Antikörperlevel steigt ebenso die Intensität der Dots, jedoch kann die visuelle Untersuchung alleine nicht die Unterschiede bzgl der Dot-Intensität erkennen wie dies bei einer Linearfunktion gegeben ist.

Die Intensität der Reaktion kann wie folgt geschätzt werden:

Positiv	+ /++/+++	Ein ausgeprägter, blauer Dot ist deutlich zu sehen; das Resultat sollte als positiv interpretiert werden.
Schwach positive	±	Der Dot ist undeutlich zu sehen; das Resultat sollte als grenzwertig interpretiert werden.
Negativ	-	Es ist kein Dot zu sehen. Das Resultat sollte als negativ interpretiert werden.

Schwach positive Reaktion (±)

Bei den meisten immunoserologischen Assays zeigen grenzwertige oder Reaktionen von geringer Intensität minimale Antikörperlevel an; nur sehr hohe Antikörperlevel sind signifikant.

Bei der zuletzt angewandten Verdünnung (1/510) zeigen einige Punkte eine schwache Reaktion (±), die schwierig zu interpretieren ist. Diese Reaktionsweise wird deshalb als grenzwertig angesehen. Deshalb raten wir in diesem Fall dazu, die Probe mittels einer niedrigeren Verdünnung (z.B. als letzte Verdünnung 1/250) zu reevaluierten, um festzustellen, ob das Ergebnis positiv ist oder nicht.

Was jedoch für jede Dot-Blot-Technik gilt ist, dass leichte Variationen der Färbungsintensität entscheidend von mehreren Faktoren abhängig sind (Inkubationen, T°, ...), was auch zwischen zwei unterschiedlichen Testläufen beobachtet werden kann: eine zuerst als schwach positiv beobachtete Reaktion (±), kann später in einem anderen Testlauf als negativ (-) angesehen werden.

Schwache Reaktionen können entweder ein geringes Level von Autoantikörpern oder unspezifische, kreuzreagierende Antikörper, wie sie in der durchschnittlichen Patientenpopulation auftreten (= natürliche Autoantikörper⁸), anzeigen. In jedem Fall sollten schwach reagierende Autoantikörper (z.B. niedrigerer Titer) dokumentiert und mit Vorsicht interpretiert werden bis eine signifikante Anzahl normaler Proben vergleichbare Reaktionen zeigt.

Qualitätskontrolle

Jeder Testlauf muss die Positivkontrolle beinhalten. Ein Nichtbeachten der Anforderungen der Qualitätskontrolle führt zur Ungültigkeit des Assay.

Positivkontrolle: Beispiel der Resultate

GANGLIO PROFILE	Positivkontrolle	Interpretation
Sulfatide	●	+
GQ1b		-
GT1b	●	++
GT1a	●	++
GD3	●	+++
GD1b	●	+
GD1a	●	+++
GM3	●	+++
GM2		-
GM1	●	±
Funkt ktrl	●	+++

Positivkontrolle

- Beachten sie das dem Kit beiliegende Qualitätskontrollblatt zur Interpretation des Resultats
- Die bei der Positivkontrolle beobachtete Reaktion kann von Charge zu Charge differieren
- Abhängig von den Inkubationsmodalitäten können die Reaktionen der Positivkontrolle entweder etwas heller oder dunkler ausfallen
- **Die mit dem Kit mitgelieferte Positivkontrolle darf auf keinen Fall als Cut-Off Wert zur Evaluierung der Proben angesehen werden**

Funktionskontrolle

- Die Funktionskontrolle, die sich auf dem Boden jeder Membran befindet, muss eine intensive Färbung zeigen (die Intensität des Funktionskontrollpunkts muss nicht wie ein Kalibrator benutzt werden)
- Die Funktionskontrolle stellt sicher, dass die im Kit verfügbaren Reagenzien aktiv und der Assay sachgerecht durchgeführt werden kann.
- Der Test muss als ungültig angesehen und wiederholt werden, wenn der Funktionskontrollpunkt auf den Streifen nicht sichtbar ist.

10. KREUZREAKTIONEN ⁷

	Struktur	Kommt ebenso vor bei :
GM1 – Epitop	Eine endständig freie Galaktose gebunden β 1- 3 an N-acetyl - Galaktosamine	GD1b
GM2 - Epitop	Eine endständig freie N-acetyl – Galaktosamine gebunden β 1-4 an Galaktose	
GM3 - Epitop	Eine endständige Galaktose gebunden β 1-3 an Glukose und gebunden α 2-3 an einen Sialinsäurerest	GD1a, GT1b
GD1a – Epitope	Eine zentrale Galaktose gebunden α 2-3 an einen Sialinsäurerest	GM1, GM2, GT1a
	Eine endständige Galaktose gebunden α 2-3 an einen Sialinsäurerest	GT1b
GD1b – Epitope	Eine zentrale Galaktose gebunden α 2-3 an 2 Sialinsäurereste gebunden α 2,8	GT1b, GQ1b
GT1a – Epitop	2 Sialinsäurereste gebunden an eine endständige Galaktose	
GQ1b - Epitope	2 Sialinsäurereste gebunden an eine endständige Galaktose	GT1a
	2 Sialinsäurereste gebunden an eine innere Galaktose	GD1b

11. FEHLERSUCHE

Unerwartete Farbentwicklungen :

- Einige Proben verursachen einen dunklen Hintergrund, eingefärbt auf der Membrane. Diese unspezifischen Reaktionen müssen als negativ interpretiert werden.
- Die nassen Streifen zeigen eine dunkle Hintergrundfärbung. Diese Färbung verschwindet, wenn die Streifen völlig getrocknet sind. Nur getrocknete (30 min) Streifen können evaluiert werden.
- Inadäquate Inkubationszeit und -temperatur
- Unkontrollierte Wasserinhaltsstoffe
- Das Substrat oder das Fläschchen, das zur Herstellung des Substrats benutzt wurde, ist mit aktiv oxidierenden Substanzen kontaminiert.

Mangelnde Präzision

- Nicht homogene Probe nach dem Einfrieren
- Eintrübung, Partikel oder ein zu hoher Lipidgehalt der Probe
- Ungleiche Volumina werden der Wanne hinzugefügt
- Inadäquate Eliminierung der Flüssigkeit
- Kein komplettes Waschen

Belassen sie die Streifen nicht zum Trocknen in den Wannern. Legen sie diese auf absorbierendes Papier.

12. GRENZEN DER DURCHFÜHRUNG

- Alle ALPHADIA kits sind diagnostische Hilfen, jedoch nicht geeignet als eigenständiger Test zur Diagnosefindung. Die Daten müssen in Verbindung mit klinischen Bewertungen und / oder anderen Laborergebnissen interpretiert werden.
- Der kit sollte nicht nach dem Verfallsdatum, das auf dem Etikett verzeichnet ist, verwendet werden.
- Die Anwendung muss bei 4°C durchgeführt werden. Eine Modifikation dieser Temperatur induziert einen Verlust der Sensibilität .

ENGLISH

IMMUNODOT ASSAY FOR THE DETERMINATION OF hIgG & hIgM OR hIg (G+M) AUTOANTIBODIES AGAINST GANGLIOSIDES IN HUMAN SERUM.

AD-GANG12, AD-GANGS12 12 Determinations
AD-GANGS24 24 Determinations

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

1. CLINICAL APPLICATIONS

Gangliosides

Gangliosides are sialic acid containing glycopingolipids composed of a long-chain aliphatic amine (ceramide) attached between one and five hexoses, at least one of which must be of sialylated. The presence of sialic acid molecule(s) attached to galactose residue(s) in the hexose core defines as glycopingolipid as a ganglioside (1).

Gangliosides are localized in the outer layer of plasma membranes and are abundant in the myelin sheath of Schwann cells (peripheral nervous system) and of oligodendrocytes (central nervous system) (2).

Neuropathy and anti-Glycoconjugate autoantibodies

The first clinical syndrome, in which anti-Glycoconjugate autoantibodies were described was the IgM Paraproteinemic Neuropathy associated with anti-MAG autoantibodies (1). Further studies revealed the presence of Peripheral Neuropathy and anti-Glycolipid autoantibodies such as anti-Ganglioside or anti-MAG in a large portion of peripheral neuropathic conditions (for review: 2-6). Initial skepticism about the significance of anti-Glycolipid autoantibodies was replaced by the recognition that these autoantibodies can contribute directly to the pathogenesis of Neuropathy.

GANGLIO Ab PROFILE		
SULFATIDES	→	SENSORY DEMYELINATING POLYNEUROPATHY (IgM)
GQ1b	→	MILLER-FISHER SYNDROME (IgG)
GT1b	→	CANOMAD (IgM)
GT1a	→	CERVICO-BRACHIAL GBS (IgG)
GD3	→	ATAXIC SENSORY NEUROPHATY
GD1b	→	- ACUTE (IgG) - CHRONIC (IgM)
GD1a	→	MOTOR NEUROPATHY (IgM)
GM3	→	CANOMAD (IgM)
GM2	→	CIDP (IgG)
GM1	→	MULTIFOCAL MOTOR NEUROPATHY (IgM) AXONAL FORM OF GBS (AMAN) (IgG)
Funct Control		

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The ALPHADIA Ganglioprofile kit provides a qualitative in-vitro assay for human autoantibodies (IgG, IgM or Ig G+M) against ten specific Gangliosides: sulfatides, GQ1b, GT1b, GT1a, GD3, GD1b, GD1a, GM3, GM2 and GM1.

During the first incubation time, the specific auto-antibodies present in diluted serum react with the dot ganglioside membrane strips. The strips are then washed to remove unbound antibodies and other serum compounds. In a second incubation time, an anti-human antibody coupled with HRP is added to the tray channel and reacts with the human IgG and IgM antibody immobilized on the membrane strips. After a new washing step to remove the conjugate unbound, specific antibodies are traced by incubation with substrate solution.

3. REAGENTS PROVIDED WITH THE KIT

1. **Coated strips** : 12 or 24 membrane strips coated with ganglioside antigens. Keep unused membrane strips at 4°C, protected from moisture with a desiccant bag.
2. **Positive control** : 1 microtube (30µl) of positive serum
Preservative : NaN₃ (<0.1%)
3. **Enzyme conjugate** : 1 or 2 vials (10 ml) of:
 - anti-hIgG conjugated to horseradish peroxidase (HRPO), for AD-GANG12
 - anti-hIgM conjugated to horseradish peroxidase (HRPO), for AD-GANG12
 - anti-hIg (G+M) conjugated to horseradish peroxidase (HRPO), for AD-GANGS12 and AD-GANGS24Preservative : Neomycin. Ready for use.
4. **Sample diluent** : 1 or 2 vials (32,5 ml) of buffer. Preservative: NaN₃ (<0.1%). Ready for use.
5. **Wash buffer** : 1 vial (40 ml) of phosphate buffer with detergent. Preservative: Thimerosal (<0.1%). Take the vial content to 400 ml (final volume) with distilled water. The diluted washing solution is stable for 1 month at 4°C.
6. **Substrate solution** : 1 or 2 vials (10ml) of tetramethylbenzidine. Ready for use.
7. **Incubation tray** : 1 or 2 x 12 channels

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Adjustable, automatic micropipettes with disposable tips.
- Graduated cylinder.
- Aspiration pump.
- Distilled water.
- Rocking shaker.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

In order to avoid personal and environmental contamination, the following precautions must be observed:

- Use disposable gloves while handling potentially infectious material and performing the assay.
- Do not pipette reagents by mouth.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics during the assay.
- Chromogen should be handled with care. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. In case of accident rinse thoroughly with running water.
- All material of human origin used for the preparation of this kit tested negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV. Since no test at present can guarantee complete absence of these viruses, all samples and reagents used for the assay must be considered potentially infectious; therefore, the assay waste must be decontaminated and disposed of, in accordance with established safety procedures. Disposable ignitable material must be incinerated; disposable non-ignitable material must be sterilized in autoclave for at least 1 hour at 121°C.
- Liquid wastes must be added with sodium hypochlorite at a final concentration of 3%. Let the hypochlorite act for at least 30 minutes. Liquid wastes containing acid must be neutralized with appropriate amounts of base before treating with sodium hypochlorite.
- Avoid splashing and aerosol formation; in case of spilling, wash carefully with a 3% sodium hypochlorite solution and dispose of this cleaning liquid as potentially infectious waste.
- Some reagents contain sodium azide as preservative; to prevent

build-up of explosive metal azides in lead and copper plumbing, reagents should be discarded by flushing the drain with large amounts of water.

In order to obtain reproducible results, the following rules must be observed:

- Do not mix reagents from different lot numbers or from other manufacturers
- Strict adherence to the specific time and temperature of incubations is recommended for accurate results
- **Allow to equilibrate the membrane strips to room temperature before open the stored tube**
- **Do not allow the reagents to equilibrate to room temperature before use, keep them at 4°C.**
- Do not use reagents beyond their expiry date
- Incomplete or inefficient washing will cause poor precision and high background
- Use thoroughly clean glassware, free from contamination of metal ions or oxidating substances.
- Use distilled water, stored in clean containers.
- Avoid any contamination among samples; for this purpose, disposable tips should be used for each sample and reagent.
- Microbially contaminated serum or specimens containing heavy, visible particulate should not be used
- Cross contaminations of reagents or sample could cause false results. Use a clean, fresh, disposable pipette tip for each reagent or specimen manipulation
- Do not expose the substrate to light storage or incubation
- Follow exact incubation times.
- A variety of factors influence the assay performance. These include the accuracy and reproducibility of pipetting technique, timing bias during the assay
- **Only dried membrane strip should be evaluated**

6. SPECIMEN COLLECTION

It is recommended to use serum. Highly lipemic or hemolyzed samples must be discarded. Keep samples at 2-8°C for 1 day; for longer periods it is advisable to freeze samples in aliquots at -20°C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

7. ASSAY PROCEDURE

ATTENTION :

INCUBATIONS WITH SERUM AND CONJUGATE MUST BE PERFORMED AT 4°C.

To prevent condensation on the strips, open the tubes containing the membrane when the strips have reached the room temperature.

Sample(s) and control predilution : 1:101

- Allocate predilution tubes to sample(s) and control
- Add 500 µl of sample diluent
- Pipette 5 µl of sample(s) and control
- Mix the tubes

Procedure

- Pipette 1 ml of sample diluent, fill each channel containing strips and incubate 10 min **at 4°C** on a rocking shaker
- Pipette 250 µl of prediluted sample and control and add them to the specific channel
- Incubate for 120 minutes **at 4°C** on a rocking shaker
- Eliminate or aspirate the liquid form from each channel
- Wash the membrane strips 3 times for 5min. **at 4°C** with 1ml of diluted washing solution
- Eliminate or aspirate the liquid form from each channel

- Add 750µl of Specific Enzyme Conjugate into the incubation tray.
- Incubate for 60 minutes **at 4°C** on a rocking shaker
- Eliminate or aspirate the liquid form from each channel
- Wash the membrane strips 3 times for 5min. with 1ml of diluted washing solution
- Wash the membrane strips 1 time with 1ml of deionised water
- Eliminate or aspirate the liquid form from each channel
- Add 750µl of substrate-chromogen solution into incubation tray
- Incubate for 10 min. at RT on a rocking shaker
- Eliminate or aspirate the liquid form from each channel
- Stop the reaction with 2ml of deionised water
- Incubate for 5 min. at RT on a rocking shaker
- Remove the strips from the channels.
- Let them air dry for 30 min and read.
- Fix the test strips to the evaluation protocol.

8. ASSAY SCHEME

Incubation tray channel	Control	Sample(s)
Coated strip	1	1
Sample diluent	1000 µl	1000 µl
- Incubate : 10 min at 4°C on a rocking shaker		
Prediluted sample(s)	----	250 µl
Prediluted positive control	250 µl	----
- Incubate : 120 min at 4°C on a rocking shaker		
- Aspirate and wash : 3 x 1000 µl: 5 min at 4°C		
HRPO conjugate	750 µl	750 µl
- Incubate : 60 min at 4°C on a rocking shaker		
- Aspirate and wash : 3 x 1000 µl of washing solution : 5 min at 4°C		
- Aspirate and wash : 1 X 1000 µl of deionised water : 5 min at 4°C		
Substrate solution	750 µl	750 µl
- Incubate : 10 min at RT on a rocking shaker		
- Aspirate the solution		
Desionised water	2000 µl	2000 µl
- Incubate : 5 min at RT on a rocking shaker		
- Air dry		
- Read after 30 min.		

9. INTERPRETATION OF RESULTS

ALPHADOTS strip interpretation

The interpretation of the results consists in a visual examination:

- Any absence of membrane colouring (whereas functional control is reacting) must be considered as a negative result
- Appearance on the membrane of one or several coloured spots (blue deposit with various intensity responses) must be considered as a positive result (+/++/+++).

The intensity of the dot reaction is directly proportional to the amount of specific autoantibodies present in the serum. As antibody levels increase, the dot intensity will also increase, however visual examination alone cannot discern differences between dot intensity that relates as a linear function.

The intensity of the reaction can be appreciated as follows:

Positive	+ /++/+++	A blue coloured distinct dot is easily seen; the result should be interpreted as positive
Weakly positive	±	The dot is not easily seen; the result should be interpreted as borderline
Negative	-	No dot is seen; the result should be interpreted as negative

Weakly positive reaction (±)

With most immunoserology assays, borderline or low intensity reactions indicate minimal antibody levels, only the very high levels in antibodies are significant.

At the final dilution of use (1/510), some spots showing a weak reaction (±) could be difficult to interpret .

This kind of reaction will have thus to be considered as borderline: in this case we advise to re-evaluate the sample at lower dilution (for example final dilution: 1/250) in order to confirm or not its positivity.

However as for any dot blot technique, slight variations of colouring intensities depending on several contributing factors (incubations, T°...) can be observed between different runs : a weakly positive reaction (±) observed at first , may be observed later as negative (-) in another run assay.

Weak reactions may either indicate low-level autoantibodies or non-specific cross-reacting antibodies, which are found in the normal patient population (= natural auto antibodies⁸). In either case, weakly reactive auto antibody (i.e. lower titer) may be reported and should be interpreted with caution since a significant number of normal specimens will have similar reactions.

Quality control

The positive control must be included in each run.

Failure to meet the quality control requirements invalidates the assay.

Positive control: example of result

GANGLIO PROFILE	Positive Control	Interpretation
Sulfatides	●	+
GQ1b		-
GT1b	●	++
GT1a	●	++
GD3	●	+++
GD1b	●	+
GD1a	●	+++
GM3	●	+++
GM2		-
GM1	●	±
Funct Ctl	●	+++

Positive control

- For the interpretation of the result, please refer to the Quality Control sheet included in the kit
- The response observed for positive control can differ from batch to batch
- Positive control reactions may be either slightly darker or lighter depending on incubations conditions.
- **Positive control provided with the kit cannot, in any case, regarded as a cut-off evaluation of the samples**

Functional control

- Functional control present on the bottom of each membrane must show an intense colouring (the intensity of the functional control dot must not be used as a calibrator)
- Functional control assures that the reagents available in the kit are active and that the assay has been performed properly.
- The test should be considered invalid and repeated if the functional control dot is not visible on the strips.

10. CROSS REACTIONS ⁷

	Structure	Also present on:
GM1 – Epitope	A terminal free galactose linked β 1- 3 to N-acetyl - galactosamine	GD1b
GM2 - Epitope	A terminal free N-acetyl – galactosamine linked β 1-4 to galactose	
GM3 - Epitope	A terminal galactose linked β 1-3 to glucose and linked α 2-3 to a sialic acid residue	GD1a, GT1b
GD1a – Epitopes	A central galactose linked α 2-3 to a sialic residue A terminal galactose linked α 2-3 to a sialic acid residue	GM1, GM2, GT1a GT1b
GD1b – Epitopes	A central galactose linked α 2-3 to 2 sialic acid residues linked α 2,8	GT1b, GQ1b
GT1a – Epitope	2 sialic acid residues linked to the terminal galactose	
GQ1b - Epitopes	2 sialic acid residues linked to the terminal galactose 2 sialic acid residues linked to the internal galactose	GT1a GD1b

11. TROUBLE SHOOTING

Unexpected colour development :

- Some sample might give a dark background staining of the membrane. These unspecific reactions have to interpreted as negative
- The wet strips show a dark background colour. This colour vanishes after the strips have dried completely. Only dried strips (30 min) should be evaluated
- Inadequate incubation time and temperature
- Uncontrolled water ingredients
- Substrate or vial used to prepare substrate is contaminated with oxidative active substances

Poor precision :

- non-homogeneous sample after freezing
- turbidity, particles or high lipid content of the sample
- unequal volumes added to the channel
- inadequate elimination of fluids
- washing was incomplete

Don't leave the strips in the channels for drying. Put them on an absorbent tissue.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- All ALPHADIA kits are a diagnostic aid and by themselves are not diagnostic. The data must be interpreted in conjunction with the clinical evaluation or/and other laboratory findings.
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- The procedure must be carry out at 4°C. A modification of this temperature induce a loss of sensibility of the dosage.

ESPAÑOL

ANÁLISIS INMUNODOT PARA LA DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS hlgG y hlgM O hlg (G+M) CONTRA GANGLIÓSIDOS EN SUERO HUMANO.

AD-GANG12, AD-GANGS12 12 determinaciones
AD-GANGS24 24 determinaciones

SÓLO PARA EL USO EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

1. APLICACIONES CLÍNICAS

Gangliósidos

Los gangliósidos consisten en glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico, compuestos de una amina alifática de cadena larga (ceramida) enlazada entre una y cinco hexosas, al menos una de las cuales debe ser sialilada. La presencia de molécula(s) de ácido siálico enlazadas a residuo(s) de galactosa en el núcleo de hexosa define un glicoesfingolípidos como gangliósido (1).

Los gangliósidos se sitúan en la capa exterior de las membranas plasmáticas y abundan en la vaina miélica de las células de Schwann (sistema nervioso periférico) y de los oligodendrocitos (sistema nervioso central) (2).

Neuropatía y autoanticuerpos antiglicoconjugado

El primer síndrome clínico en el que se describieron autoanticuerpos antiglicoconjugado fue la neuropatía paraproteínica asociada con autoanticuerpos anti-MAG (1). Estudios posteriores revelaron la presencia, en casos de neuropatía periférica, de autoanticuerpos antiglicolípido tales como antigangliósidos o anti-MAG. 2-6). El escepticismo inicial acerca de la significación de los autoanticuerpos antiglicolípido dio paso al reconocimiento de que estos autoanticuerpos pueden contribuir directamente a la patogénesis de la neuropatía.

GANGLIO Ab PROFILE	
SULFÁTIDOS	→ POLINEUROPATÍA SENSORIAL DESMIELINIZANTE (IgM)
GQ1b	→ SÍNDROME DE MILLER-FISHER (IgG)
GT1b	→ CANOMAD (IgM)
GT1a	→ SGB CÉRVICO-BRAQUIAL (IgG)
GD3	→ NEUROPATÍA SENSORIAL ATÁXICA
GD1b	→ - AGUDA (IgG) - CRÓNICA (IgM)
GD1a	→ NEUROPATÍA MOTRIZ (IgM)
GM3	→ CANOMAD (IgM)
GM2	→ CIDP: Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (IgG)
GM1	→ NEUROPATÍA MOTRIZ MULTIFOCAL (IgM) FORMA AXONAL DE SGB (AMAN (IgG)
Control funcional	

2. PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

El kit Ganglioprofile ALPHADIA proporciona un análisis *in vitro* cualitativo de autoanticuerpos (IgG, IgM o Ig G+M) frente a diez gangliósidos específicos: sulfátidos, GQ1b, GT1b, GT1a, GD3, GD1b, GD1a, GM3, GM2 y GM1.

Durante el primer período de incubación, los autoanticuerpos específicos presentes en el suero diluido reaccionan con las tiras (filtros) de membrana de gangliósidos. Las tiras de filtro se lavan después para eliminar los anticuerpos no enlazados y otros compuestos del suero. En un segundo período de incubación, un anticuerpo antihumano combinado con HRP se añade al canal de la bandeja y reacciona con el anticuerpo humano IgG e IgM inmovilizados en las tiras de filtro de membrana. Después de una nueva etapa de lavado para eliminar el conjugado no unido, se marcan anticuerpos específicos por incubación con solución de sustrato.

3. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL KIT

- Tiras de filtro recubiertas:** 12 ó 24 tiras de filtro de membrana recubiertas con antígenos de gangliósidos. Mantenga las tiras de filtro de membrana no utilizadas a 4°C; protéjalas de la humedad con una bolsa secante.
- Control positivo:** 1 microtubo (30 µl) de suero positivo
Conservante: NaN₃ (<0,1%).
- Conjugado enzimático:** 1 ó 2 viales (10 ml) de:
 - conjugado anti-hlgG con peroxidasa de rábano (HRPO), para AD-GANG12
 - conjugado anti-hlgM con peroxidasa de rábano (HRPO), para AD-GANG12
 - anti-hlg (G+M) conjugado con peroxidasa de rábano (HRPO), para AD-GANGS12 y AD-GANGS24Conservante: Neomicina. Listo para el uso
- Diluyente de muestra:** 1 ó 2 viales (32,5 ml) de tampón.
Conservante: NaN₃ (<0,1%). Listo para el uso
- Tampón de lavado.** 1 vial (40 ml) de tampón fosfato con detergente. Conservante: Timerosal (<0,1%). Añada agua destilada al contenido del vial hasta alcanzar 400 ml (volumen final). La solución de lavado diluida se mantiene estable durante 1 mes a 4°C.
- Solución de sustrato:** 1 ó 2 viales (10 ml) de tetrametilbencidina. Lista para el uso.
- Bandeja de incubación:** 1 ó 2 x 12 canales

4. MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

- Micropipetas automáticas ajustables con puntas desechables.
- Cilindro graduado.
- Bomba de aspiración
- Agua destilada.
- Agitador basculante.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para evitar contaminación personal y ambiental, deberán observarse las siguientes precauciones

- Utilice **guantes** desechables para manipular material potencialmente infeccioso y realizar el análisis.
- No **pipetee** reactivos con la boca.
- **Durante** el análisis no fume, coma ni beba. Tampoco debe aplicarse ningún cosmético.
- El **cromógeno** deben manipularse con precaución. Evite el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas. En caso de accidente, aclare abundantemente con agua corriente.
- **Todos** los materiales de origen humano utilizados para la preparación de este kit deben haber sido sometidos a análisis de HBsAg, anti-VIH y anti-HCV, con resultados negativos. Dado que actualmente ninguna prueba puede garantizar la total ausencia de estos virus, todos los reactivos y las muestras utilizados para el análisis deben ser considerados como potencialmente infecciosos; por lo tanto, los desechos de los análisis deben ser descontaminados y eliminados con arreglo a los procedimientos de seguridad establecidos. El material desechable que sea inflamable debe ser incinerado; el material desechable no inflamable debe ser esterilizado en autoclave, al menos durante 1 hora a 121°C.

- A los desechos **líquidos** debe añadirse hipoclorito sódico en una concentración final al 3%. Deje que el hipoclorito actúe durante 30 minutos, como mínimo. Los desechos líquidos que contengan ácido deben ser neutralizados con cantidades de base apropiadas antes del tratamiento con hipoclorito sódico.
- Evite **salpicaduras** y la formación de aerosol; en caso de salpicaduras, lave cuidadosamente con una solución de hipoclorito sódico al 3% de sodio y deseche este líquido resultante de la limpieza como residuo potencialmente infeccioso.
- Algunos **reactivos** contienen azida de sodio como conservante; para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en cañerías de plomo y cobre, los reactivos deben desecharse por los desagües correspondientes con grandes cantidades de agua.

Para conseguir resultados reproducibles, deberán observarse las siguientes normas:

- No mezcle reactivos de lotes con números distintos ni de otros fabricantes.
- Se recomienda respetar rigurosamente los tiempos y temperaturas específicos para las incubaciones con objeto de obtener resultados precisos.
- **Deje que las tiras de filtro de membrana alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el tubo almacenado.**
- **No deje los reactivos a temperatura ambiente antes de utilizarlos; manténgalos a 4°C.**
- No utilice reactivos después de que se haya cumplido su fecha de caducidad.
- Un lavado incompleto o poco eficaz irá en detrimento de la precisión y redundará en un alto nivel de distorsión de fondo.
- Utilice material de vidrio totalmente limpio, sin ningún tipo de contaminación de iones metálicos o sustancias oxidantes.
- Utilice agua destilada, almacenada en recipientes limpios.
- Evite que se produzca cualquier contaminación entre muestras; para ello, deberán utilizarse puntas desechables para cada muestra y reactivo
- No debe utilizarse suero con contaminación microbiana ni muestras que contengan partículas visibles.
- La contaminación entre reactivos o muestras puede provocar resultados falsos. Utilice una punta de pipeta desechable nueva y limpia para cada manipulación de reactivo o muestra.
- No exponga el sustrato a una incubación ni a un almacenamiento con luz.
- Respete rigurosamente los tiempos de incubación.
- En el resultado del análisis influyen diversos factores. Entre ellos se incluyen la precisión y reproducibilidad de la técnica de pipeteo, el fotómetro utilizado y la desviación de la sincronización durante el análisis.
- **Sólo deben evaluarse las tiras de filtro de membrana secas.**

6. RECOGIDA DE MUESTRAS

Se recomienda utilizar suero. Deberán descartarse las muestras demasiado lipémicas o hemolizadas. Mantenga las muestras a 2-8°C durante 1 día; para períodos más largos se recomienda congelar las muestras en porciones alícuotas a -20°C. Debe evitarse la congelación y descongelación repetida de las muestras.

7. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

ATENCIÓN :

LAS INCUBACIONES CON SUERO Y CONJUGADO DEBEN REALIZARSE A 4°C.

Para evitar que se produzca condensación en las tiras de filtro, abra los tubos que contienen la membrana cuando las tiras de filtro hayan alcanzado la temperatura ambiente.

Predilución de control y muestra(s): 1:101

- Asigne los tubos de predilución a la(s) muestras y al control.
- Añada 500 µl de diluyente de muestra.
- Pipetee 5 µl de muestra(s) y control.
- Mezcle el contenido de los tubos.

Procedimiento

- Pipetee 1 ml de diluyente de muestra, llene todos los canales que contengan tiras de filtro e incube durante 10 minutos a 4°C en un agitador basculante.
- Pipetee 250 µl de predilución de muestra y control y añádalos al canal específico.
- Incube durante 120 minutos a 4°C en un agitador basculante.
- Elimine o aspire la forma líquida de cada canal.
- Lave las tiras de filtro de membrana 3 veces durante 5 minutos a 4°C con 1 ml de solución de lavado diluida.
- Elimine o aspire la forma líquida de cada canal.
- Añada 750µl de conjugado enzimático específico en la bandeja de incubación.
- Incube durante 60 minutos a 4°C en un agitador basculante.
- Elimine o aspire la forma líquida de cada canal.
- Lave las tiras de filtro de membrana 3 veces durante 5 minutos con 1 ml de solución de lavado diluida.
- Lave las tiras de filtro de membrana 1 vez con 1 ml de agua desionizada.
- Elimine o aspire la forma líquida de cada canal.
- Añada 750 µl de solución de sustrato-cromógeno en la bandeja de incubación.
- Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente en un agitador basculante.
- Elimine o aspire la forma líquida de cada canal.
- Detenga la reacción con 2 ml de agua desionizada.
- Incube durante 5 minutos a temperatura ambiente en un agitador basculante.
- Quite las tiras de los canales.
- Déjelas secar con aire durante 30 minutos y efectúe la lectura.
- Fije las tiras de ensayo al protocolo de evaluación.

8. ESQUEMA DEL ANÁLISIS

Canal de bandeja de incubación	Control	Muestra(s)
Tira de filtro recubierta	1	1
Diluyente de muestra	1.000 µl	1.000 µl
- Incubar: 10 minutos a 4°C en un agitador basculante.		
Muestra(s) prediluida(s)	----	250 µl
Control positivo prediluido	250 µl	----
- Incubar: 120 minutos a 4°C en un agitador basculante. - Aspirar y lavar: 3 x 1.000 µl: 5 minutos a 4°C		
Conjugado HRPO	750 µl	750 µl
- Incubar: 60 minutos a 4°C en un agitador basculante. - Aspirar y lavar: 3 x 1.000 µl de solución de lavado diluida: 5 minutos a 4°C - Aspirar y lavar: 1 x 1.000 µl de agua desionizada: 5 minutos a 4°C		
Solución de sustrato	750 µl	750 µl
- Incubar: 10 minutos a temperatura ambiente en un agitador basculante. - Aspirar la solución.		
Agua desionizada	2.000 µl	2.000 µl
- Incubar: 5 minutos a temperatura ambiente en un agitador basculante - Secar con aire. - Efectuar la lectura (después de 30 minutos).		

9. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Interpretación de la tira ALPHADOTS

La interpretación de los resultados consiste en un examen visual:

- Toda ausencia de color de la membrana (mientras que el control funcional sí reacciona) debe considerarse como resultado negativo.
- La aparición en la membrana de una o varias manchas coloreadas (depósito azul con respuestas de diferente intensidad) debe considerarse como resultado positivo (+/++/+++).

La intensidad de la reacción de las manchas es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero. A medida que aumenta la concentración de anticuerpos, la intensidad de la mancha también aumentará, aunque el simple examen visual no puede establecer diferencias en la intensidad de la mancha siguiendo una función lineal.

La intensidad de la reacción puede apreciarse como sigue:

Positiva	+ /++/+++	Se aprecia claramente una mancha de color azul; el resultado debe considerarse positivo.
Débilmente positiva	±	La mancha no se ve fácilmente; el resultado debe considerarse dudoso.
Negativa	-	No se observa ninguna mancha; el resultado debe considerarse negativo.

Reacción débilmente positiva (±)

En la mayoría de ensayos de inmunoserología, las reacciones dudosas o de intensidad leve indican concentraciones mínimas de anticuerpos, y solamente son significativos las concentraciones muy altas de anticuerpos.

En la dilución final del uso (1/510), puede ser difícil de interpretar algunas manchas que muestran una reacción débil (±). Este tipo de reacción deberá considerarse dudosa. En este caso, recomendamos volver a evaluar la muestra a menor dilución (por ejemplo, una dilución final de 1/250) para confirmar su positividad o no.

Sin embargo, al igual que con cualquier otra técnica de manchas, se pueden observar variaciones leves en la intensidad de la coloración entre las diferentes pruebas efectuadas, dependiendo de diferentes factores (incubaciones, temperatura, etc.); una reacción positiva débil (±) observada primero puede luego apreciarse como negativa (-) en otra ejecución de esa prueba.

Las reacciones débiles pueden indicar una concentración baja de anticuerpos o una reacción cruzada a anticuerpos no específicos, que se encuentran en la población normal de pacientes (= autoanticuerpos naturales⁶). En ambos casos, puede observarse un autoanticuerpo débilmente reactivo (es decir, título bajo), que deberá interpretarse con precaución puesto que un número significativo de muestras normales tendrá reacciones similares.

Control de calidad

El control positivo debe incluirse en cada ejecución de la prueba. El no cumplimiento de los requisitos de control de calidad invalida el ensayo.

Control positivo: ejemplo de resultado

GANGLIO PROFILE	Control Positivo	Interpretación
Sulfátidos	●	+
GQ1b	●	-
GT1b	●	++
GT1a	●	++
GD3	●	+++
GD1b	●	+
GD1a	●	+++
GM3	●	+++
GM2	●	-
GM1	●	±
Funct Ctl	●	+++

Control Positivo

- Para la interpretación del resultado, consulte la hoja de Control de calidad incluida en el kit.
- La respuesta observada para el control positivo puede diferir entre lotes.
- Las reacciones de control positivas pueden ser ligeramente más oscuras o claras según las condiciones de incubación.
- **El control positivo suministrado con el kit no puede, bajo ninguna circunstancia, considerarse como una evaluación de corte de las muestras.**

Control funcional

- El control funcional presente en el fondo de cada membrana debe mostrar una coloración intensa (la intensidad de la mancha de control funcional no debe utilizarse como calibrador).
- El control funcional garantiza que los reactivos disponibles en el kit son activos y que el ensayo se ha efectuado adecuadamente.
- La prueba debe considerarse no válida y deberá repetirse si la mancha de control funcional no es visible en las tiras.

10. REACIONES CRUZADAS ⁷

	Estructura	También presente en:
GM1 – Epítotope	Galactosa terminal libre con enlace β 1- 3 a N-acetil – galactosamina	GD1b
GM2 – Epítotope	N-acetil–galactosamina terminal libre con enlace β 1-4 a galactosa	
GM3 – Epítotope	Galactosa terminal con enlace β 1-3 a glucosa y enlace α 2-3 a un residuo de ácido siálico.	GD1a, GT1b
GD1a – Epítotope	Galactosa central con enlace α 2-3 a un residuo siálico	GM1, GM2, GT1a
	Galactosa terminal con enlace α 2-3 a un residuo de ácido siálico	GT1b
GD1b – Epítotope	Galactosa central con enlace α 2-3 a 2 residuos de ácido siálico con enlace α 2,8	GT1b, GQ1b
GT1a – Epítotope	2 residuos de ácido siálico con enlace a la galactosa terminal	
GQ1b – Epítotope	2 residuos de ácido siálico con enlace a la galactosa terminal	GT1a
	2 residuos de ácido siálico con enlace a la galactosa interna	GD1b

11. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Evolución inesperada del color:

- Algunas muestras podrían presentar una coloración oscura de fondo en la membrana. Estas reacciones inespecíficas deben interpretarse como negativas.
- Las tiras de filtro húmedas presentan un color de fondo oscuro. Este color se desvanece cuando las tiras están totalmente secas. Sólo deben evaluarse las tiras de filtro secas (30 minutos).
- Tiempo y temperatura de incubación inadecuados.
- Ingredientes no controlados en el agua.
- El sustrato o el vial utilizado para preparar sustrato está contaminado con sustancias activas oxidativas.

Precisión escasa:

- Muestra no homogénea después de la congelación.
- Turbidez, presencia de partículas o alto contenido de lípidos en la muestra.
- Los volúmenes añadidos al canal son desiguales.
- Eliminación de fluidos inadecuada.
- Lavado incompleto.

No deje secar las tiras en los canales. Colóquelas en un algodón hidrófilo.

12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Todos los kits ALPHADIA constituyen una ayuda para el diagnóstico, no un diagnóstico por sí solo. Los datos deben ser interpretados conjuntamente con la evaluación clínica y otros resultados de laboratorio.
- El kit no debe utilizarse después de la fecha de caducidad que figura en la etiqueta.
- El procedimiento debe realizarse a 4°C. Cualquier modificación de esta temperatura provocará una pérdida de sensibilidad de la dosificación.

ΕΛΛΗΝΙΚΑ

ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΥΠΟΥ DOT ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ hlgG & hlgM Ή hlg (G+M) ΕΝΑΝΤΙ ΓΑΓΓΛΙΟΣΙΔΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ.

AD-GANG12, AD-GANGS12 12 προσδιορισμοί
AD-GANGS24 24 προσδιορισμοί

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO

1. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Γαγγλιοσίδες

Οι γαγγλιοσίδες είναι σιαλικό οξύ που περιέχει γλυκοσφιγγολιπίδια, τα οποία αποτελούνται από μια αλειφατική αμίνη μεγάλης αλυσίδας (κεραμίδιο) συνδεδεμένη με μία έως πέντε εξόζες, τουλάχιστον μία από τις οποίες πρέπει να είναι σιαλικωμένες. Η παρουσία μορίου/μορίων σιαλικού οξέος συνδεδεμένων σε υπόλειμμα/σε υπολείμματα γαλακτόζης στον πυρήνα της εξόζης ορίζει το γλυκοσφιγγολιπίδιο ως γαγγλιοσίδη (1).

Οι γαγγλιοσίδες εντοπίζονται στην εξωτερική στιβάδα μεμβρανών πλάσματος και υπάρχουν σε μεγάλη ποσότητα abundant στον υμένα μελίνης των κυττάρων Schwann (περιφερικό νευρικό σύστημα) και των ολιγοδενδροκυττάρων (κεντρικό νευρικό σύστημα) (2).

Νευροπάθεια και αυτοαντισώματα αντι-γλυκοσυζεύγματος

Το πρώτο κλινικό σύνδρομο, στο οποίο περιγράφηκαν τα αυτοαντισώματα αντι-γλυκοσυζεύγματος ήταν η IgM παραπρωτεϊναιμική νευροπάθεια που σχετίζεται με τα αυτοαντισώματα αντι-MAG (1). Περαιτέρω μελέτες απεκάλυψαν την παρουσία περιφερικής νευροπάθειας και αυτοαντισωμάτων αντι-γλυκολιπιδίων όπως αντι-γαγγλιοσιδών ή αντι-MAG σε μεγάλη αναλογία περιπτώσεων περιφερικής νευροπάθειας (για περαιτέρω μελέτη: 2-6). Ο αρχικός σκεπτικισμός σχετικά με τη σημαντικότητα των αντι-γλυκολιπιδίων αυτοαντισωμάτων υποχώρησε μπροστά στη διαπίστωση ότι αυτά τα αυτοαντισώματα μπορούν να συνεισφέρουν απευθείας στην παθογένεση της νευροπάθειας.

ΓΑΓΓΛΙΟ-ΠΡΟΦΙΛ Ab		
ΣΟΥΛΦΑΤΙΔΙΑ	→	ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΑΚΗ ΑΠΟΜΥΕΛΙΝΩΤΙΚΗ ΠΟΛΥΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ (IgM)
GQ1b	→	ΣΥΝΔΡΟΜΟ MILLER-FISHER (IgG)
GT1b	→	CANOMAD (IgM)
GT1a	→	ΑΥΧΕΝΟ-ΒΡΑΧΙΟΝΙΚΗ GBS (IgG)
GD3	→	ΑΤΑΞΙΑΚΗ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΑΚΗ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ
GD1b	→	- ΟΞΕΙΑ (IgG) - ΧΡΟΝΙΑ (IgM)
GD1a	→	ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ (IgM)
GM3	→	CANOMAD (IgM)
GM2	→	CIDP (IgG)
GM1	→	ΠΟΛΥΕΣΤΙΑΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ (IgM) ΑΞΟΝΙΚΗ ΜΟΡΦΗ GBS (AMAN) (IgG)
Έλεγχος λειτουργιών		

2. ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Το kit γαγγλιοπροφίλ ALPHADIA παρέχει έναν ποιοτικό προσδιορισμό in-vitro για ανθρώπινα αντισώματα (IgG, IgM ή Ig G+M) έναντι δέκα συγκεκριμένων γαγγλιοσιδίων: Σουλφατιδίων, GQ1b, GT1b, GT1a, GD3, GD1b, GD1a, GM3, GM2 και GM1.

Κατά τη διάρκεια του πρώτου χρόνου επώασης, τα ειδικά αυτοαντισώματα που είναι παρόντα στον αραιωμένο ορό αντιδρούν με τις σειρές κουκκίδων μεμβράνης γαγγλιοσιδίων. Στη συνέχεια οι σειρές υποβάλλονται σε πλύση για να απομακρυνθούν τα μη δεσμευμένα αντισώματα και άλλες ενώσεις του ορού. Σε ένα δεύτερο χρόνο επώασης, προστίθεται στο κανάλι του δίσκου ένα αντι-ανθρώπινο αντίσωμα συζευγμένο με HRP, το οποίο αντιδρά με το ανθρώπινο αντίσωμα IgG και IgM που έχει ακινητοποιηθεί στις σειρές μεμβράνης. Μετά από ένα νέο βήμα έκπλυσης για να αφαιρεθεί το μη δεσμευμένο σύζευγμα, λαμβάνει χώρα ιχνηθέτηση των ειδικών αντισωμάτων μέσω επώασης με διάλυμα υποστρώματος.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ KIT

- Επιστρωμένες σειρές:** 12 ή 24 σειρές μεμβράνης επιστρωμένες με αντιγόνα γαγγλιοσιδίων. Οι μη χρησιμοποιημένες σειρές μεμβράνης να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 4°C, προστατευμένες από την υγρασία με ένα σακουλάκι αποξηραντικού παράγοντα.
- Θετικός ορός ελέγχου:** 1 μικροσωληνάριο (30μl) θετικού ορού
Συντηρητικό: NaN₃ (<0,1%)
- Αντιδραστήριο συζευγμένο με ένζυμο:** 1 ή 2 φιαλίδια (10 ml) με:
 - αντι-hIgG συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRPO), για το AD-GANG12
 - αντι-hIgM συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRPO), για το AD-GANG12
 - αντι-hIg (G+M) συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRPO), για τα AD-GANGS12 και AD-GANGS24Συντηρητικό: Νεομυκίνη. Έτοιμο για χρήση.
- Αραιωτικό δειγμάτων:** 1 ή 2 φιαλίδια (32,5 ml) ρυθμιστικού διαλύματος. Συντηρητικό: NaN₃ (<0,1%). Έτοιμο για χρήση.
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης:** 1 φιαλίδιο (40 ml) ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με απορροπτικό. Συντηρητικό: Thimerosal (<0,1%). Αραιώστε το περιεχόμενο του φιαλιδίου με αποσταγμένο νερό μέχρι τα 400 ml (τελικός όγκος). Το αραιωμένο διάλυμα πλύσης παραμένει σταθερό επί 1 μήνα στους 4° C.
- Διάλυμα υποστρώματος:** 1 ή 2 φιαλίδια (10ml) τετραμεθυλοβενζιδίνης. Έτοιμο για χρήση.
- Δίσκος επώασης:** 1 ή 2 x 12 καναλιών

4.ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Ρυθμιζόμενες, αυτόματες μικροπιπέτες με άκρα μίας χρήσης.
- Διαβαθμισμένος κύλινδρος.
- Αντλία αναρρόφησης
- Απεσταγμένο νερό.
- Αναδευτήρας με δόνηση.

5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Προκειμένου να αποφευχθεί η μόλυνση σε ανθρώπους και στο περιβάλλον, θα πρέπει να ληφθούν οι ακόλουθες προφυλάξεις:

- Χρησιμοποιείτε γάντια μίας χρήσης όταν χειρίζεστε δυνητικώς μολυσματικό υλικό και εκτελείτε τον προσδιορισμό.
- Μην διανέμετε τα αντιδραστήρια με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας.
- Μην καπνίζετε, μην τρώτε, μην πίνετε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού.
- Ο χειρισμός της χρωμογόνου ουσίας και του ανασταλτικού αντιδραστήριου πρέπει να γίνεται με προσοχή. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα, τα μάτια και τους βλεννογόνους. Σε περίπτωση ατυχήματος, ξεβγάλετε καλά με τρεχούμενο νερό.

- Όλα τα υλικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή αυτού του kit εξετάστηκαν και βρέθηκαν αρνητικά για HBsAg, αντι-HIV και αντι-HCV. Επειδή επί του παρόντος καμία εξέταση δεν μπορεί να εγγυηθεί την πλήρη απουσία των ιών αυτών, όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικώς μολυσματικά. Επομένως, τα απόβλητα μετά τον προσδιορισμό πρέπει να υποβάλλονται σε απολύμανση και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις καθιερωμένες διαδικασίες ασφαλείας. Τα εύφλεκτα υλικά μίας χρήσης πρέπει να αποτεφρώνονται. Τα μη εύφλεκτα υλικά μίας χρήσης πρέπει να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο επί τουλάχιστον 1 ώρα σε θερμοκρασία 121° C.
- Στα υγρά απόβλητα πρέπει να προστίθεται υποχλωριώδες νάτριο σε τελική συγκέντρωση 3%. Αφήστε το υποχλωριώδες νάτριο να δράσει επί τουλάχιστον 30 λεπτά. Τα υγρά απόβλητα που περιέχουν οξύ πρέπει να υποβάλλονται σε εξουδετέρωση με τις κατάλληλες ποσότητες βάσης πριν την επεξεργασία με το υποχλωριώδες νάτριο.
- Αποφύγετε το πισίλισμα και το σχηματισμό αερολύματος. Σε περίπτωση που χυθεί το υγρό, πλύνετε προσεκτικά με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 3% και απορρίψτε αυτό το καθαριστικό υγρό ως δυνητικώς μολυσματικό υλικό.
- Μερικά αντιδραστήρια περιέχουν αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό. Για να αποφύγετε τη συσσώρευση εκρηκτικών αζιδίων μετάλλων στους σωληνούς της αποχέτευσης που είναι από μόλυβδο και χαλκό, τα αντιδραστήρια πρέπει να απορρίπτοντας ξεπλένοντας ταυτόχρονα την αποχέτευση με μεγάλες ποσότητες νερού.

Προκειμένου να πάρετε αναπαραγωγίμα αποτελέσματα, θα πρέπει να τηρηθούν οι ακόλουθοι κανόνες:

- Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες ή διαφορετικούς κατασκευαστές.
- Για αποτελέσματα ακριβείας, συνιστάται να τηρούνται αυστηρά ο ειδικός χρόνος και η θερμοκρασία επώασεων
- **Επιτρέψτε στις σειρές μεμβράνης να ισορροπήσουν με τη θερμοκρασία δωματίου πριν ανοίξετε το σωληνάριο όπου φυλάσσονται**
- **Μην επιτρέψτε στα αντιδραστήρια να ισορροπήσουν με τη θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους, διατηρείτε τα στους 4°C.**
- Μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Ατελής ή ανεπαρκής έκπλυση θα μειώσει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων και θα προκαλέσει υψηλό υπόβαθρο.
- Χρησιμοποιείτε πολύ καθαρά γυάλινα δοχεία, χωρίς μόλυνση από ιόντα μετάλλων ή οξειδωτικές ουσίες.
- Χρησιμοποιείτε αποσταγμένο νερό, αποθηκευμένο σε καθαρούς περιέκτες.
- Αποφύγετε τη μόλυνση από δείγμα σε δείγμα. Για το σκοπό αυτό, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για κάθε δείγμα και αντιδραστήριο άκρα μίας χρήσης.
- Δε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μικροβιακά μολυσμένος ορός ή δείγματα που περιέχουν βαριά, ορατή σωματιδιακή ύλη.
- Επιμολύνσεις των αντιδραστηρίων ή του δείγματος θα μπορούσαν να προκαλέσουν ψευδή αποτελέσματα. Χρησιμοποιήστε ένα καινούριο άκρο πιπέτας μίας χρήσης για το χειρισμό κάθε αντιδραστηρίου ή δείγματος.
- Κατά τη φύλαξη ή την επώαση, μην αφήνετε το υπόστρωμα εκτεθειμένο στο φως.
- Τηρείτε με ακρίβεια τους χρόνους επώασης.
- Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την απόδοση του προσδιορισμού. Σ' αυτούς περιλαμβάνεται η ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα της τεχνικής για τη διανομή με πιπέτα, το φωτόμετρο που χρησιμοποιείται, οι χρονικές αποκλίσεις κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού
- **Πρέπει να γίνεται αξιολόγηση μόνο ξηρασμένων σειρών μεμβράνης**

6. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Συνιστάται η χρήση ορού. Ιδιαίτερα λιπαιμικά ή αιμολυμένα δείγματα θα πρέπει να απορρίπτονται. Κρατήστε τα δείγματα στους 2-8° C επί 1 ημέρα. Για μεγαλύτερες περιόδους θα σας συνιστούσαμε να καταψύξετε τα δείγματα σε κλάσματα (δόσεις) στους -20° C. Θα πρέπει να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

ΠΡΟΣΟΧΗ:

ΟΙ ΕΠΩΑΣΕΙΣ ΜΕ ΟΡΟ ΚΑΙ ΣΥΖΕΥΓΜΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΚΤΕΛΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ 4° C.

Για να αποτραπεί η συμπύκνωση υγρασίας στις σειρές, ανοίξτε τα σωληνάκια που περιέχουν τη μεμβράνη αφού οι σειρές έχουν φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Προαραίωση δείγματος/δειγμάτων και ορού ελέγχου: 1:101

- Επιλέξτε σωληνάκια προαραίωσης για το δείγμα/τα δείγματα και τον ορό ελέγχου
- Προσθέστε 500 μl αραιωτικού δειγμάτων
- Διανείμετε με πιπέτα 5 μl δείγματος/δειγμάτων και ορού ελέγχου
- Αναμείξτε τα σωληνάκια

Διαδικασία

- Διανείμετε με πιπέτα 1 ml αραιωτικού δειγμάτων, γεμίστε κάθε κανάλι που περιέχει σειρές και επώαστε για 10 λεπτά **στους 4° C** σε έναν αναδευτήρα με δόνηση.
- Διανείμετε με πιπέτα 250 μl προαραιωμένου δείγματος και ορού ελέγχου και προσθέστε τα στο συγκεκριμένο κανάλι
- Επώαστε για 120 λεπτά **στους 4° C** σε έναν αναδευτήρα με δόνηση
- Αποβάλετε ή αναρροφήστε την υγρή μορφή από κάθε κανάλι
- Πλύνετε τις σειρές μεμβράνης 3 φορές επί 5 λεπτά **στους 4° C** με 1 ml αραιωμένου διαλύματος πλύσης
- Αποβάλετε ή αναρροφήστε την υγρή μορφή από κάθε κανάλι
- Προσθέστε 750μl ειδικού αντιδραστήριου συζευγμένου με ένζυμο στο δίσκο επώασης.
- Επώαστε για 60 λεπτά **στους 4° C** σε έναν αναδευτήρα με δόνηση
- Αποβάλετε ή αναρροφήστε την υγρή μορφή από κάθε κανάλι
- Πλύνετε τις σειρές μεμβράνης 3 φορές επί 5 λεπτά με 1 ml αραιωμένου διαλύματος πλύσης
- Πλύνετε τις σειρές μεμβράνης 1 φορά με 1ml αποιονισμένου νερού
- Αποβάλετε ή αναρροφήστε την υγρή μορφή από κάθε κανάλι
- Προσθέστε 750 μl διαλύματος υποστρώματος-χρωμογόνου ουσίας στο δίσκο επώασης
- Επώαστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε έναν αναδευτήρα με δόνηση
- Αποβάλετε ή αναρροφήστε την υγρή μορφή από κάθε κανάλι
- Σταματήστε την αντίδραση με 2ml αποιονισμένου νερού
- Επώαστε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε έναν αναδευτήρα με δόνηση
- Αφαιρέστε τις σειρές από τα κανάλια.

- Αφήστε τις να ξηρανθούν με αέρα επί 30 λεπτά και προβείτε στην ανάγνωσή τους.
- Στερεώστε τις σειρές εξέτασης στο πρωτόκολλο αξιολόγησης.

8. ΣΧΕΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Κανάλι δίσκου επώασης	Ορός	Δείγμα/δείγματα
Επιστρωμένη σειρά	1	1
Αραιωτικό δείγματος	1000 μl	1000 μl
- Επώαστε: 10 λεπτά στους 4° C σε αναδευτήρα με δόνηση		
Προαραιωμένο δείγμα/δείγματα	----	250 μl
Προαραιωμένος ορός ελέγχου	θετικός 250 μl	----
- Επώαστε: 120 λεπτά στους 4° C σε αναδευτήρα με δόνηση - Αναρροφήστε και εκπλύνετε: 3 x 1000 μl : 5 λεπτά στους 4° C		
Αντιδραστήριο με HRPO	συζευγμένο 750 μl	750 μl
- Επώαστε: 60 λεπτά στους 4° C σε αναδευτήρα με δόνηση - Αναρροφήστε και εκπλύνετε: 3 x 1000 μl αραιωμένου διαλύματος πλύσης : 5 λεπτά στους 4° C - Αναρροφήστε και εκπλύνετε: 1 x 1000 μl αποιονισμένου νερού: 5 λεπτά στους 4° C		
Διάλυμα υποστρώματος	750 μl	750 μl
- Επώαστε: 10 λεπτά σε ΘΔ σε αναδευτήρα με δόνηση - Αναρροφήστε το διάλυμα		
Απιοιονισμένο νερό	2000 μl	2000 μl
- Επώαστε: 5 λεπτά σε ΘΔ σε αναδευτήρα με δόνηση - Ξηράνετε με αέρα - Προβείτε στην ανάγνωση (Μετά από 30 λεπτά)		

9. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ερμηνεία σειρών ALPHADOTS

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων βασίζεται σε μια οπτική εξέταση:

- Κάθε απουσία χρωματισμού της μεμβράνης (ενώ αντιδρά ο ορός ελέγχου λειτουργίας) πρέπει να θεωρείται ως αρνητικό αποτέλεσμα
- Εμφάνιση πάνω στη μεμβράνη μίας ή αρκετών χρωματιστών κηλίδων (κυανό ίζημα με διάφορες αποκρίσεις έντασης) πρέπει να θεωρείται ως θετικό αποτέλεσμα (+/+/+/+).

Η ένταση της αντίδρασης με στύπωμα κηλίδων είναι ευθέως ανάλογη προς την ποσότητα των ειδικών αυτοαντισωμάτων που υπάρχουν στον ορό. Καθώς αυξάνονται τα επίπεδα των αντισωμάτων, θα αυξηθεί και η ένταση των κηλίδων, ωστόσο η οπτική εξέταση από μόνη της δεν μπορεί να ξεχωρίσει διαφορές ανάμεσα στην ένταση των κηλίδων που αναφέρεται ως γραμμική λειτουργία.

Η ένταση της αντίδρασης μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

Θετικό	+ /+/+/+	Διακρίνεται εύκολα μια σαφής κηλίδα κυανού χρώματος. Το αποτέλεσμα θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως θετικό.
Εβδομαδιαία θετικό	±	Η κηλίδα δεν διακρίνεται εύκολα. Το αποτέλεσμα θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως οριακό
Αρνητικό	-	Δεν διακρίνεται κηλίδα. Το αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνευτεί ως αρνητικό

Εβδομαδιαία θετική αντίδραση (±)

Με τους περισσότερους ανοσο-ορολογικούς προσδιορισμούς, οριακές ή χαμηλής έντασης αντιδράσεις υποδηλώνουν ελάχιστα επίπεδα αντισωμάτων, σημαντικά είναι μόνον τα πολύ υψηλά επίπεδα στα αντισώματα.

Στην τελική αραίωση χρήσης (1/510), μερικές κηλίδες που εμφανίζουν ασθενή αντίδραση (±) θα μπορούσε να είναι δύσκολο να ερμηνευτούν. Επομένως, αυτό το είδος της αντίδρασης θα πρέπει να θεωρηθεί ως οριακό: στην περίπτωση αυτή, θα σας συμβουλευάμε να αξιολογήσετε εκ νέου το δείγμα σε χαμηλότερη αραίωση (για παράδειγμα, τελική αραίωση: 1/250) προκειμένου να επιβεβαιώσετε ή όχι τη θετικότητα του.

Ωστόσο, όπως ισχύει για οποιαδήποτε τεχνική με σύτρωμα κηλίδων, ελαφρές διακυμάνσεις στις εντάσεις του χρώματος που εξαρτώνται από αρκετούς συνεισφέροντες παράγοντες (επτάσεις, T°...) μπορούν να παρατηρηθούν μεταξύ διαφορετικών εκτελέσεων: μια εβδομαδιαία θετική αντίδραση (±) που παρατηρήθηκε αρχικά, μπορεί να παρατηρηθεί αργότερα ως αρνητική (-) σε μια άλλη εκτέλεση προσδιορισμού.

Ασθενείς αντιδράσεις ενδέχεται να υποδηλώνουν είτε αυτοαντισώματα χαμηλού επιπέδου είτε μη ειδικά αντισώματα διασταυρούμενης αντίδρασης, τα οποία βρίσκονται στον πληθυσμό των φυσιολογικών ασθενών (= φυσικά αυτοαντισώματα⁸). Και στις δύο περιπτώσεις, ενδέχεται να αναφερθεί αυτοαντίσωμα εβδομαδιαίας αντίδρασης (δηλ. χαμηλός τίτλος) και θα πρέπει να ερμηνεύεται προσεκτικά εφόσον παρόμοιες αντιδράσεις θα έχει και ένας σημαντικός αριθμός φυσιολογικών δειγμάτων.

Ποιοτικός έλεγχος

Σε κάθε εκτέλεση θα πρέπει να περιλαμβάνεται ο θετικός ορός ελέγχου.

Αν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις του ποιοτικού ελέγχου, ο προσδιορισμός θεωρείται άκυρος.

Θετικός ορός ελέγχου: παράδειγμα αποτελέσματος

GANGLIO PROFILE	Θετικός ορός ελέγχου	Ερμηνεία
Σουλφατίδια	●	+
GQ1b		-
GT1b	●	++
GT1a	●	++
GD3	●	+++
GD1b	●	+
GD1a	●	+++
GM3	●	+++
GM2		-
GM1	●	±
Funct Ctl	●	+++

Θετικός ορός ελέγχου

- Για την ερμηνεία του αποτελέσματος, παρακαλούμε ανατρέξτε στο φύλλο ποιοτικού ελέγχου που περιλαμβάνεται στο κιτ
- Η απόκριση που παρατηρείται για το θετικό ορό ελέγχου μπορεί να διαφέρει από παρτίδα σε παρτίδα
- Οι αντιδράσεις με θετικό ορό ελέγχου μπορεί να είναι είτε ελαφρώς πιο σκούρες είτε ελαφρώς πιο ανοιχτόχρωμες ανάλογα με τις συνθήκες επώασης.
- **Ο θετικός ορός ελέγχου που παρέχεται με το κιτ δεν μπορεί, σε καμία περίπτωση, να θεωρηθεί ως αξιολόγηση οριακής τιμής (cut-off) των δειγμάτων**

Ορός ελέγχου λειτουργίας

- Ο ορός ελέγχου λειτουργίας που υπάρχει στο κάτω μέρος κάθε μεμβράνης πρέπει να εμφανίζει έντονο χρωματισμό (η ένταση της κηλίδας του ορού ελέγχου λειτουργίας δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως βαθμονομητής)
- Ο ορός ελέγχου λειτουργίας διασφαλίζει ότι τα αντιδραστήρια που διατίθενται με το κιτ είναι δραστικά και ότι ο προσδιορισμός έχει εκτελεστεί σωστά.
- Η εξέταση θα πρέπει να θεωρείται άκυρη και να επαναλαμβάνεται αν η κηλίδα του ορού ελέγχου λειτουργίας δεν είναι ορατή πάνω στις σειρές.

10. ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ⁷

	Δομή	Επίσης παρούσα σε:
GM1 – Επιτόπος	Μια γαλακτόζη χωρίς άκρα συνδεδεμένη β 1-3 με N-ακετυλο-γαλακτοζαμίνη	GD1b
GM2 - Επιτόπος	Μια N-ακετυλο-γαλακτοζαμίνη χωρίς άκρα συνδεδεμένη β 1-4 με γαλακτόζη	
GM3 - Επιτόπος	Μια γαλακτόζη με άκρα συνδεδεμένη β 1-3 με γλυκόζη και συνδεδεμένη α 2-3 με υπόλειμμα σιαλικού οξέος	GD1a, GT1b
GM1a – Επιτόπος	Μια κεντρική γαλακτόζη συνδεδεμένη α 2-3 με υπόλειμμα σιαλικού οξέος	GM1, GM2, GT1a
	Μια γαλακτόζη με άκρα συνδεδεμένη α 2-3 με υπόλειμμα σιαλικού οξέος	GT1b
GM1b – Επιτόπος	Μια κεντρική γαλακτόζη συνδεδεμένη α 2-3 με 2 υπολείμματα σιαλικού οξέος συνδεδεμένα α 2,8	GT1b, GQ1b
GT1 – Επιτόπος	2 υπολείμματα σιαλικού οξέος συνδεδεμένα με γαλακτόζη με άκρα	
GQ1b - Επιτόπος	2 υπολείμματα σιαλικού οξέος συνδεδεμένα με γαλακτόζη με άκρα	GT1a
	2 υπολείμματα σιαλικού οξέος συνδεδεμένα με εσωτερική γαλακτόζη	GD1b

11. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

Απροσδόκητη παρουσία χρώματος:

- Ορισμένα δείγματα μπορεί να προκαλέσουν μια σκουρόχρωμη χρώση στο φόντο της μεμβράνης. Αυτές οι μη ειδικές αντιδράσεις πρέπει να ερμηνευθούν ως αρνητικές

- Οι υγρές σειρές έχουν σκούρο χρώμα φόντου. Αυτό το χρώμα εξαφανίζεται αφού οι σειρές ξηρανθούν εντελώς. Πρέπει να γίνεται αξιολόγηση μόνο ξηρασμένων σειρών (30 λεπτά).
- Ανεπαρκής χρόνος και θερμοκρασία επώασης
- Ανεξέλεγκτα συστατικά νερού
- Το υπόστρωμα ή το φιαλίδιο είναι μολυσμένο με ενεργές οξειδωτικές ουσίες

Χαμηλή ακρίβεια:

- Μη ομοιογενές δείγμα μετά την ψύξη
- Θολρότητα, σωματίδια ή υψηλό περιεχόμενο σε λιπίδια στο δείγμα
- Προσθήκη άνισων όγκων στο κανάλι
- Ανεπαρκής απομάκρυνση των υγρών
- Η πλύση δεν ολοκληρώθηκε

Μην αφήνετε τις σειρές να ξηρανθούν μέσα στα κανάλια. Τοποθετήστε τις επάνω σε ένα απορροφητικό κομμάτι ύφασμα.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

- Όλα τα κιτ ALPHADIA αποτελούν διαγνωστικό βοήθημα και δεν είναι καθαρά διαγνωστικές εξετάσεις. Τα δεδομένα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με την κλινική αξιολόγηση ή/και άλλα εργαστηριακά ευρήματα.
- Το κιτ δεν πρέπει να χρησιμοποιείται μετά την ημερομηνία λήξης στην ετικέτα του κιτ.
- Η διαδικασία πρέπει να διεξαχθεί σε θερμοκρασία 4°C. Αν τροποποιηθεί αυτή η θερμοκρασία ενδέχεται να προκληθεί απώλεια ευαισθησίας της δόσης.

FRANCAIS

DOSAGE IMMUNODOT POUR LA DETERMINATION DES AUTO-ANTICORPS IgGh & IgMh OU Igh (G+M) DIRIGES CONTRE LES GANGLIOSIDES DANS LE SERUM HUMAIN.

AD-GANG12, AD-GANGS12 12 déterminations
AD-GANGS24 24 déterminations

UNIQUEMENT A USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO

1. APPLICATIONS CLINIQUES

Gangliosides

Les gangliosides sont des glycosphingolipides contenant de l'acide sialique. Ils sont composés d'une longue chaîne d'amines aliphatiques (céramides) et d'un chaînon de un à cinq hexoses dont au moins un doit être sialylé. Un ganglioside (1) est un glycosphingolipide ayant une(des) molécule(s) d'acide sialique attachée(s) au(x) résidu(s) galactose de l'anneau d'hexose.

Les gangliosides se trouvent dans la couche la plus externe des membranes plasmiques et abondent dans la gaine de myéline des cellules de Schwann (système nerveux périphérique) et des oligodendrocytes (système nerveux central) (2).

Neuropathies et auto-anticorps anti-Glycoconjugué

Le premier syndrome clinique dans lequel on a décrit des auto-anticorps anti-Glycoconjugué a été la neuropathie avec paraprotéinémie à IgM associée à des auto-anticorps anti-MAG. Des études ultérieures ont révélé la présence d'une neuropathie périphérique et d'auto-anticorps anti-glycolipides, tels que les anti-Ganglioside ou anti-MAG, dans une grande proportion des neuropathies périphériques (références : 2-6). Le scepticisme de départ quant à la signification des auto-anticorps anti-Glycolipides a fait place à la reconnaissance que ces auto-anticorps peuvent directement contribuer à la pathogénèse de la neuropathie.

PROFILE des AC anti-GANGLIO		
SULFATIDES	→	POLYNEUROPATHIE SENSORIELLE DEMYELINISANTE (IgM)
GQ1b	→	SYNDROME de MILLER-FISHER (IgG)
GT1b	→	CANOMAD (IgM)
GT1a	→	GBS CERVICO-BRACHIAL (IgG)
GD3	→	NEUROPHATHIE ATAXIQUE SENSORIELLE - AIGUE (IgG) - CHRONIQUE (IgM)
GD1b	→	
GD1a	→	NEUROPATHIE MOTRICE (IgM)
GM3	→	CANOMAD (IgM)
GM2	→	CIDP (IgG)
GM1	→	NEUROPATHIE MOTRICE MULTIFOCAL (IgM) FORME AXONALE de GBS (AMAN) (IgG)
Contrôle du fonctionnement		

2. PRINCIPE DE L'ANALYSE

La trousse ALPHADIA Ganglioprofile fournit une analyse in vitro qualitative pour la détection des auto-anticorps humains (IgG, IgM ou Ig G+M) dirigés contre les Gangliosides spécifiques: sulfatides, GQ1b, GT1b, GT1a, GD3, GD1b, GD1a, GM3, GM2 et GM1.

Lors de la première incubation, les auto-anticorps spécifiques présents dans le sérum dilué réagissent avec les gangliosides adsorbés à la surface des bandelettes. Les bandelettes sont ensuite lavées pour enlever les anticorps non liés et les autres composants du sérum. Lors de la seconde incubation, on ajoute un anticorps anti-humain couplé à la HRP dans le canal de la plaque. Il réagit avec les anticorps humains IgG et IgM immobilisés à la surface des bandelettes. Une nouvelle étape de lavage enlève le conjugué non lié. Les anticorps spécifiques sont ensuite révélés par incubation avec la solution contenant le substrat.

3. REACTIFS FOURNIS AVEC LA TROUSSE

- Bandelettes recouvertes d'antigènes** : 12 ou 24 bandelettes recouvertes d'antigènes ganglioside. Conserver les bandelettes non utilisées à 4°C. Les protéger des moisissures avec un sachet de dessiccateur.
- Contrôle positif** : 1 microtube (30µl) de sérum positif
Conservateur: NaN₃ (<0.1 %)
- Enzyme liée au conjugué** : 1 ou 2 flacons (10 ml) de:
 - anti-IgGh conjugué à la peroxydase de raifort (HRPO) pour AD-GANG12
 - anti-IgMh conjugué à la peroxydase de raifort (HRPO) pour AD-GANG12
 - anti-Ig(G+M)h conjugué à la peroxydase de raifort (HRPO), pour AD-GANGS-12 et AD-GANGS24Conservateur: Néomycine. Prête à l'emploi.
- Diluant des échantillons** : 1 ou 2 flacons (32,5 ml) de tampon.
Conservateur: NaN₃ (<0.1 %). Prêt à l'emploi.
- Tampon de lavage** : 1 flacon (40 ml) de tampon phosphate contenant un détergent. Conservateur: Thimérosal (<0.1 %). Diluer le contenu du flacon avec de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 400 ml (volume final). La solution de lavage diluée est stable 1 mois à 4°C.
- Solution du substrat** : 1 ou 2 flacons (10ml) de tétraméthylbenzidine. Prête à l'emploi.
- Plaque d'incubation** : 1 ou 2 x 12 canaux

4. MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- micropipettes automatiques réglables, avec embouts jetables.
- cylindre gradué.
- pompe d'aspiration
- eau distillée.
- Agitateur basculant.

5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

Afin d'éviter toute contamination personnelle ou de l'environnement, les précautions suivantes doivent être observées :

- Utiliser des gants jetables lors de l'utilisation de matériel potentiellement infecté et lors de la réalisation du dosage ;
- Ne pas pipeter à la bouche ;
- Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller durant le dosage ;
- Eviter tout contact de la solution du substrat chromogène avec la peau ou des muqueuses. En cas de contact, laver avec un savon désinfectant et rincer abondamment ;
- Tout matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation des réactifs de la trousse a été testé et trouvé négatif pour HBsAg, anti-HIV et anti-HCV. Etant donné qu'aucun test ne peut garantir l'absence absolue de ces virus, tous les échantillons et réactifs utilisés lors du dosage doivent être considérés comme

potentiellement infectieux. Tous les déchets produits lors du dosage, doivent être décontaminés et éliminés en respectant les mesures de sécurité. Le matériel jetable combustible doit être incinéré, le matériel jetable non-combustible doit être stérilisé à l'autoclave pendant au moins 1 heure à 121 °C.

- Il faut ajouter aux déchets liquides de l'hypochlorite de soude de manière à obtenir une concentration finale de 3 % (v/v). Laisser agir l'hypochlorite de soude au moins 30 minutes. Les déchets liquides contenant de l'acide doivent être neutralisés avec la quantité adéquate de base avant traitement à l'hypochlorite de soude.
- Eviter les éclaboussures et la formation d'aérosol, en cas d'éclaboussure, laver soigneusement avec de l'hypochlorite de soude à 3 % (v/v) et traiter ce liquide de lavage comme potentiellement infectieux.
- 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.

Afin d'obtenir des résultats reproductibles, les règles suivantes doivent être observées :

- Ne pas mélanger les réactifs de lots différents ou fournis par d'autres fabricants.
- Respecter exactement les temps et la température d'incubation spécifiques pour assurer la précision des résultats.
- **Attendre que les bandelettes soient à température ambiante avant d'ouvrir le tube de stockage.**
- **Ne pas mettre les réactifs à température ambiante avant utilisation. Les conserver à 4°C.**
- Ne pas utiliser des réactifs après leur date de péremption ;
- Le lavage inachevé ou inefficace entraînera des imprécisions et un bruit de fond élevé.
- Utiliser de la verrerie parfaitement propre, sans trace de contamination par des ions métalliques ou des substances oxydantes
- Utiliser de l'eau distillée conservée dans des réservoirs parfaitement propres ;
- Eviter toute contamination des échantillons. Pour ce faire, utiliser des embouts jetables pour chaque échantillon et réactif ;
- Le sérum ou les spécimens contaminés par des agents microbiens ou contenant des particules lourdes visibles ne doivent pas être employés.
- Ne pas exposer les réactifs à la lumière directe durant leur conservation ou durant l'incubation.
- Respecter les temps exacts d'incubation.
- Une variété de facteurs influencent l'exécution de l'analyse. Ceux-ci incluent l'exactitude et la reproductibilité de la technique de prélèvement, le biais du minutage pendant l'analyse.
- **N'évaluer que des bandelettes sèches.**

6. ECHANTILLONS A TESTER

Les analyses doivent être réalisées avec des échantillons de sérums. Évitez d'employer les sérums hémolysés ou lipémiques. Stockez l'échantillon à tester à 2-8°C pendant 1 jour maximum. Si un délai plus long est prévu, stockez les sérums à -20°C. Evitez les cycles répétés de congélation/décongélation.

7. REALISATION DU DOSAGE

ATTENTION :
LES INCUBATIONS DU SERUM ET DU CONJUGUE DOIVENT ETRE REALISEES A 4°C.

Afin d'éviter la condensation sur les bandelettes, n'ouvrir les tubes les contenant que lorsqu'elles ont atteint la température ambiante.

Prédilution des échantillons et du contrôle : 1:101

- Attribuer des tubes de prédilution aux échantillons et au contrôle
- Ajouter 500 µl de diluant des échantillons
- Pipeter 5 µl d'échantillons et de contrôle
- Mélanger les tubes

Procédure

- Pipeter 1 ml de diluant des échantillons, remplir chaque canal contenant une bandelette et incubé 10 min à 4°C sur un agitateur basculant
- Pipeter 250 µl d'échantillon prédilué et de contrôle et les ajouter aux canaux spécifiques
- Incuber 120 minutes à 4°C sur un agitateur basculant
- Eliminer ou aspirer le liquide de chaque canal
- Laver les bandelettes 3 fois pendant 5 min. à 4°C avec 1 ml de la solution de lavage diluée
- Eliminer ou aspirer le liquide de chaque canal
- Ajouter 750µl de l'enzyme liée au conjugué spécifique dans la plaque d'incubation
- Incuber 60 minutes à 4°C sur un agitateur basculant
- Eliminer ou aspirer le liquide de chaque canal
- Laver les bandelettes 3 fois pendant 5 min. avec 1 ml de la solution de lavage diluée
- Laver les bandelettes 1 fois avec 1 ml d'eau désionisée
- Eliminer ou aspirer le liquide de chaque canal
- Ajouter 750µl de la solution de substrat chromogène dans la plaque d'incubation
- Incuber 10 min. à température ambiante sur un agitateur basculant
- Eliminer ou aspirer le liquide de chaque canal
- Arrêter la réaction avec 2 ml d'eau désionisée
- Incuber 5min. à température ambiante sur un agitateur basculant
- Sortir les bandelettes des canaux
- Laisser sécher 30 min à l'air et lire
- Fixer la bandelette d'analyse suivant le protocole d'évaluation.

8. SCHEMA DE LA PROCEDURE A SUIVRE

Canal de la plaque d'incubation	Contrôle	Echantillon(s)
Bandelette recouverte d'antigènes	1	1
Diluant des échantillons	1000 µl	1000 µl
- Incuber : 10 min à 4°C sur un agitateur basculant		
Echantillon(s) prédilué(s)	----	250 µl
Contrôle positif prédilué	250 µl	----
- Incuber : 120 min à 4°C sur un agitateur basculant - Aspirer et laver : 3 x 1000 µl : 5 min à 4°C		
Conjugué HRPO	750 µl	750 µl
- Incuber : 60 min à 4°C sur un agitateur basculant - Aspirer et laver : 3 x 1000 µl de solution de lavage diluée : 5 min à 4°C - Aspirer et laver : 1 x 1000 µl d'eau désionisée: 5 min à 4°C		
Solution du substrat	750 µl	750 µl
- Incuber : 10 min à température ambiante sur un agitateur basculant - Aspirer la solution		
Eau désionisée	2000 µl	2000 µl
- Incuber : 5 min. à RT sur agitateur basculant - Sécher à l'air - Lire après 30 min.		

9. INTERPRETATION DES RESULTATS

ALPHADOTS interprétation

L'interprétation des résultats consiste en une analyse visuelle des membranes :

Toute absence de coloration sur la membrane (alors que le contrôle fonctionnel réagit) doit être considérée comme un résultat négatif
L'apparition sur la membrane d'un ou de plusieurs spot(s) coloré(s) (précipité bleu de diverses intensités de coloration) doit être considéré comme résultat positif (+/+/+++).

L'intensité de la coloration du spot est directement proportionnelle à la quantité d'auto anticorps spécifiques présents dans le sérum : plus le taux d'anticorps augmente, plus la coloration du spot est intense. Toutefois il est à noter qu'il n'existe pas de relation linéaire stricte entre le taux d'anticorps et l'intensité du spot révélé. L'examen visuel seul ne permet donc pas d'estimer le titre exact du sérum étudié en fonction de l'intensité du spot révélé.

Les résultats observés peuvent être interprétés comme suit :

Positif	+ /+/+++	Un spot distinct de coloration bleue est clairement visible ; le résultat doit être considéré comme positif
Faiblement positif	±	Le spot est peu visible et difficile à interpréter; le résultat doit être considéré comme équivoque (*)
Négatif	-	Aucun spot n'est visible ; le résultat doit être interprété comme négatif

(*) Réponses faiblement positives (±)

Dans la plupart des tests immunosérologiques, des réponses équivoques ou de faible intensité indiquent un taux d'anticorps faible ; seuls les titres très élevés en anticorps sont significatifs.

A la dilution finale d'utilisation (1/510), certains spots peuvent présenter une réaction de faible intensité (±) et être assez difficiles à interpréter. Ces types de réponses doivent être considérés comme équivoques : dans ce cas afin de confirmer ou non la positivité, il est conseillé d'évaluer à nouveau l'échantillon à une dilution moins élevée (par exemple en dilution finale : 1/250).

De légères variations d'intensité de coloration, dépendant des conditions de réalisation du test (incubations, T°...), peuvent être observées entre tests : une réponse faiblement positive (±) obtenue dans un premier test peut ensuite être observée négative (-) lors d'un second test.

Des réactions de faible intensité peuvent aussi indiquer de faibles taux d'anticorps ou des réactions croisées non spécifiques qui sont trouvées dans la population normale (= auto anticorps naturels⁸).

Dans ce cas, ces auto anticorps de faible intensité doivent être signalés et interprétés avec précaution puisqu'un grand nombre d'échantillons normaux peuvent présenter le même type de réactions.

Contrôle de qualité

Le contrôle positif doit être inclus lors de chaque analyse. Ne pas mesurer les résultats du contrôle de qualité invalide les analyses.

Contrôle positif : exemple de résultat

GANGLIO PROFILE	Contrôle positif	Interprétation
Sulfatides	●	+
GQ1b		-
GT1b	●	++
GT1a	●	++
GD3	●	+++
GD1b	●	+
GD1a	●	+++
GM3	●	+++
GM2		-
GM1	●	±
Fonct Ctl	●	+++

Contrôle positif

- Pour l'interprétation des résultats se référer à la feuille de Contrôle de qualité fournie dans la trousse.
- Le type de réponse observée pour le contrôle positif peut différer d'un lot à l'autre de contrôle.
- L'intensité de coloration du contrôle positif peut légèrement varier en fonction des conditions de réalisation du test .
- **Le contrôle positif fourni dans la trousse ne peut en aucun cas être considéré comme une valeur seuil (cut-off) pour l'interprétation des résultats.**

Contrôle fonctionnel

- Le contrôle fonctionnel présent au bas de chaque membrane doit montrer un spot de coloration intense (l'intensité du contrôle fonctionnel ne peut être utilisée comme valeur seuil).
- La présence du contrôle fonctionnel garanti que les réactifs fournis avec la trousse sont actifs et que le test a été réalisé correctement.
- L'analyse doit être considérée comme invalide et répétée si le spot du contrôle fonctionnel n'apparaît pas au bas de la membrane.

10. REACTIONS CROISEES⁷

	Structure	Aussi présentes sur :
Epitope GM1	Un galactose terminal libre lié par une liaison β 1-3 à la N-acétyl-galactosamine	GD1b
Epitope GM2	Une N-acétyl-galactosamine terminale libre liée par une liaison β 1-4 au galactose	
Epitope GM3	Un galactose terminal lié par une liaison β 1-3 au glucose et par une liaison α 2-3 à un résidu d'acide sialique	GD1a, GT1b
Epitopes GD1a	Un galactose central lié par une liaison α 2-3 à un résidu sialique Un galactose terminal lié par une liaison α 2-3 à un résidu d'acide sialique	GM1, GM2, GT1a GT1b
Epitopes GD1b	Un galactose central lié par une liaison α 2-3 et une liaison α 2-8 à 2 résidus d'acide sialique	GT1b, GQ1b
Epitope GT1a	2 résidus d'acide sialique liés au galactose terminal	
Epitopes GQ1b	2 résidus d'acide sialique liés au galactose terminal 2 résidus d'acide sialique lié au galactose intérieur	GT1a GD1b

11. CAUSES DE PERTURBATION DE L'ANALYSE

Développement d'une couleur inattendue :

- Avec certains échantillons, la bandelette peut présenter une coloration de fond sombre. Ces réactions non spécifiques doivent être considérées comme étant négatives
- Les bandelettes mouillées montrent une coloration de fond sombre. Cette coloration disparaît lorsque les bandelettes ont séché complètement. Il ne faut évaluer que les bandelettes sèches (30 min.)
- temps d'incubation et température inadéquats
- composants de l'eau non contrôlés
- le substrat ou le flacon utilisé pour préparer le substrat sont contaminés par des substances oxydantes

Mauvaise précision :

- échantillon non homogène après surgélation
- turbidité, particules ou forte teneur de l'échantillon en lipides
- volumes inégaux ajoutés au canal
- élimination inadéquate des liquides
- lavage incomplet

Ne pas laisser les bandelettes dans le canal lors du séchage. Appliquer les sur un buvard.

12. LIMITES D'UTILISATION

- Toutes les trousse ALPHADIA sont une aide au diagnostic, mais ne constituent pas un diagnostic en elles-mêmes. Les données doivent être interprétées en corrélation avec l'évaluation clinique et/ou d'autres résultats de laboratoire.
- Ne pas utiliser la trousse après la date de péremption inscrite sur l'étiquette.
- La procédure doit être réalisée à 4°C. Une modification de cette température entraîne une perte de sensibilité du dosage.

ITALIANO

TEST IMMUNODOT PER LA DETERMINAZIONE DEGLI AUTOANTICORPI hIgG e hIgM OPPURE hIg (G+M) CONTRO I GANGLIOSIDI NEL SIERO UMANO.

AD-GANG12 , AD-GANGS12 12 determinazioni
AD-GANGS24 24 determinazioni

SOLO PER DIAGNOSTICA IN VITRO

1. APPLICAZIONI CLINICHE

Gangliosidi

I gangliosidi sono glicosfingolipidi contenenti acido sialico composti da un'ammina alifatica a catena lunga (ceramide) legata tra uno e cinque esosi, di cui almeno uno deve risultare sialilato. La presenza di molecole di acido sialico legate a residui di galattosio nel nucleo esoso definisce sia un glicosfingolipide sia un ganglioside (1).

I gangliosidi sono localizzati nello strato esterno delle membrane plasmatiche e sono fortemente presenti nella guaina mielinica delle cellule di Schwann (sistema nervoso periferico) e degli oligodendrociti (sistema nervoso centrale) (2).

Neuropatia e autoanticorpi anti-glicoconiugati

La prima sindrome clinica nella quale sono stati descritti gli autoanticorpi anti-glicoconiugati è stata la Neuropatia paraproteinemica IgM associata ad autoanticorpi anti-MAG (1). Ulteriori studi hanno rivelato la presenza di Neuropatia periferica ed autoanticorpi anti-glicolipidi quali gli anti-gangliosidi o anti-MAG nella maggior parte delle situazioni neuropatiche periferiche (si veda: 2-6). Ad un iniziale scetticismo sulla rilevanza degli autoanticorpi anti-glicolipidi si è andato via via sostituendo il riconoscimento della capacità di detti autoanticorpi di contribuire direttamente alla patogenesi della Neuropatia.

PROFILO GANGLIO Ab		
SULFATIDI	→	POLINEUROPATIA SENSORIALE DEMIELINIZZANTE (IgM)
GQ1b	→	SINDROME DI MILLER-FISHER (IgG)
GT1b	→	CANOMAD (IgM)
GT1a	→	GBS CERVICO-BRACHIALE (IgG)
GD3	→	NEUROPATIA SENSORIALE ATASSICA - ACUTA (IgG) - CRONICA (IgM)
GD1b	→	
GD1a	→	NEUROPATIA MOTORIA (IgM)
GM3	→	CANOMAD (IgM)
GM2	→	CIDP (IgG)
GM1	→	NEUROPATIA MOTORIA MULTIFOCALE (IgM) FORMA ASSONICA DI GBS (AMAN) (IgG)
Controllo funz.		

2. PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il kit ALPHADIA Ganglioprofile offre un test in vitro qualitativo per gli autoanticorpi umani (IgG, IgM oppure Ig G+M) contro dieci gangliosidi specifici: sulfatidi, GQ1b, GT1b, GT1a, GD3, GD1b, GD1a, GM3, GM2 e GM1.

Durante il primo periodo di incubazione, gli autoanticorpi specifici presenti nel siero diluito reagiscono con le strisce di membrana del ganglioside *dot*. Successivamente le strisce vengono lavate per rimuovere gli anticorpi non legati e altri componenti del siero. In un secondo tempo di incubazione, un anticorpo antiumano coniugato con HRP viene aggiunto al canale del vassoio e reagisce con l'anticorpo IgG e IgM umano immobilizzato sulle strisce della membrana. Dopo una nuova fase di lavaggio volta alla rimozione del coniugato non legato, gli anticorpi specifici vengono tracciati dall'incubazione con soluzione di substrato.

3. REAGENTI FORNITI UNITAMENTE AL KIT

- Strisce ricoperte:** 12 o 24 strisce di membrana ricoperte con antigeni di ganglioside. Conservare in un sacchetto dessiccante le strisce di membrana inutilizzate a 4°C al riparo dall'umidità.
- Controllo positivo:** 1 microprovetta (30µl) di siero positivo
Conservante: NaN₃ (<0,1%)
- Coniugato enzimatico:** 1 o 2 fiale (10 ml) di:
 - anti-hIgG coniugato con perossidasi di rafano (HRPO), per AD-GANG12
 - anti-hIgM coniugato con perossidasi di rafano (HRPO), per AD-GANG12
 - anti-hIg (G+M) coniugato con perossidasi di rafano (HRPO), per AD-GANGS12 e AD-GANGS24Conservante: Neomicina. Pronto per l'uso.
- Diluyente per campioni:** 1 o 2 fiale (32,5 ml) di buffer.
Conservante: NaN₃ (<0,1%). Pronto per l'uso.
- Buffer di lavaggio:** 1 fiala (40 ml) di soluzione tampone fosfato con detergente. Conservante: Timerosal (<0,1%). Allungare il contenuto della fiala con acqua distillata fino a raggiungere i 400 ml (volume finale). A 4°C la soluzione di lavaggio diluita si mantiene stabile per un mese.
- Soluzione di substrato:** 1 o 2 fiale (10ml) di tetrametilbenzidina.
Pronta per l'uso.
- Vassoio di incubazione:** 1 o 2 x 12 canali

4. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Micropipette automatiche e regolabili con puntali usa e getta.
- Cilindro graduato.
- Pompa di aspirazione.
- Acqua distillata.
- Agitatore oscillante.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Al fine di evitare la contaminazione del personale e dell'ambiente è necessario osservare le seguenti precauzioni:

- Utilizzare guanti usa e getta per maneggiare materiali potenzialmente infettivi e per eseguire il dosaggio.
- Non pipettare i reagenti con la bocca.
- Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici durante il dosaggio.
- Maneggiare con cura il cromogeno. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le membrane mucose. In caso di incidente, risciacquare abbondantemente con acqua corrente.
- Tutti i materiali di origine umana utilizzati per la preparazione del presente kit sono risultati negativi ai test per HbsAg, anti-HIV e anti-HCV. Dal momento che allo stato attuale nessun test è in grado di garantire la completa assenza di questi virus, tutti i campioni e i reagenti utilizzati per il dosaggio devono essere considerati potenzialmente infettivi. Pertanto i rifiuti ottenuti dal

dosaggio andranno decontaminati e smaltiti conformemente alle procedure di sicurezza stabilite. I materiali usa e getta infiammabili devono essere inceneriti, i materiali usa e getta non infiammabili devono essere sterilizzati in autoclave per almeno 1 ora a 121°C.

- Ai rifiuti liquidi deve essere aggiunto ipoclorito di sodio a una concentrazione finale del 3%. Lasciare agire l'ipoclorito per almeno 30 minuti. I rifiuti liquidi contenenti acidi devono essere neutralizzati con la quantità appropriata di base prima di essere trattati con ipoclorito di sodio.
- Evitare gli spruzzi e la formazione di nebulizzazione; in caso di gocciolamento lavare accuratamente con una soluzione di ipoclorito di sodio al 3% e smaltire questo liquido detergente come rifiuto potenzialmente infettivo.
- Alcuni reagenti contengono sodio azide come conservante. Per evitare la formazione di azidi metalliche esplosive nelle tubazioni igienico sanitarie di piombo e rame, è necessario eliminare i reagenti lavando con abbondante acqua il canale di scolo.

Per ottenere risultati riproducibili è necessario osservare le seguenti regole:

- Non miscelare reagenti appartenenti a numeri di lotto diversi oppure a ditte produttrici diverse
- Per ottenere risultati accurati si consiglia di attenersi strettamente al tempo e alla temperatura di incubazione specificati
- **Prima di aprire la provetta conservata, lasciare che le strisce di membrana si portino a temperatura ambiente**
- **Evitare che i reagenti si portino a temperatura ambiente prima dell'uso, ma mantenerli a 4°C.**
- Non utilizzare i reagenti oltre la rispettiva data di scadenza
- Un lavaggio incompleto o inefficiente potrà comportare una scarsa precisione e un'eccessiva colorazione di fondo
- Utilizzare articoli in vetro ben puliti, esenti da contaminazione di ioni di metallo o sostanze ossidanti.
- Utilizzare acqua distillata, conservata in recipienti puliti.
- Evitare qualsiasi contaminazione tra i campioni. A tal fine utilizzare per ciascun campione e reagente i puntali usa e getta.
- Non utilizzare siero contaminato da microbi oppure campioni contenenti particolato pesante visibile
- La contaminazione crociata di reagenti o di campioni potrebbe falsare i risultati. Utilizzare per ciascun reagente oppure per manipolare i campioni, puntali per pipette pulite, nuove e usa e getta
- Non esporre il substrato a una conservazione o incubazione alla luce
- Attenersi esattamente al tempo di incubazione.
- Il risultato del dosaggio dipende da una varietà di fattori, tra cui figurano l'accuratezza e la riproducibilità delle tecniche di pipettaggio e la polarizzazione di sincronizzazione durante il dosaggio.
- **Esaminare esclusivamente le strisce asciutte**

6. RACCOLTA DEI CAMPIONI

Si consiglia di utilizzare il siero. È necessario scartare i campioni altamente lipemici o emolizzati. Mantenere per 1 giorno i campioni a una temperatura di 2-8 °C: per periodi più lunghi si consiglia di congelare i campioni in aliquote a una temperatura di -20°C. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni.

7. PROCEDURA DI DOSAGGIO

ATTENZIONE :

ESEGUIRE LE INCUBAZIONI CON SIERO E CONIUGATO A 4°C.

Per impedire la formazione di condensa sulle strisce, aprire le provette contenenti la membrana una volta che le strisce si siano portate a temperatura ambiente.

Prediluizione dei campioni e del controllo: 1:101

- Posizionare le provette per la prediluizione dei campioni e del controllo
- Aggiungere 500 µl di diluente per campioni
- Pipettare 5 µl di campioni e di controllo
- Agitare le provette

Procedura

- Pipettare 1 ml di diluente per campioni, riempire ciascun canale contenente le strisce e incubare per 10 min a 4°C su un agitatore oscillante
- Pipettare 250 µl di campione e di controllo prediluito e aggiungerlo al canale specifico
- Incubare per 120 minuti a 4°C su un agitatore oscillante
- Eliminare o aspirare il liquido da ciascun canale
- Lavare 3 volte le strisce di membrana per 5 min a 4°C con 1 ml di soluzione di lavaggio diluita
- Eliminare o aspirare il liquido da ciascun canale
- Aggiungere 750µl di Coniugato enzimatico specifico nel vassoio di incubazione.
- Incubare per 60 minuti a 4°C su un agitatore oscillante
- Eliminare o aspirare il liquido da ciascun canale
- Lavare 3 volte le strisce di membrana per 5 min con 1 ml di soluzione di lavaggio diluita
- Lavare una volta le strisce di membrana con 1 ml di acqua deionizzata
- Eliminare o aspirare il liquido da ciascun canale
- Aggiungere 750µl di soluzione substrato-cromogeno nel vassoio di incubazione
- Incubare per 10 min a temperatura ambiente su un agitatore oscillante
- Eliminare o aspirare il liquido da ciascun canale
- Arrestare la reazione con 2 ml di acqua deionizzata
- Incubare per 5 min a temperatura ambiente su un agitatore oscillante
- Rimuovere le strisce dai canali.
- Lasciarle asciugare all'aria per 30 minuti e quindi leggerle.
- Fissare le strisce del test al protocollo di valutazione.

8. SCHEMA DEL DOSAGGIO

Canale del vassoio di incubazione	Controllo	Campioni
Striscia ricoperta	1	1
Diluente per campioni	1000 µl	1000 µl
- Incubare: per 10 min a 4°C su un agitatore oscillante		
Campioni prediluiti	----	250 µl
Controllo positivo prediluito	250 µl	----
- Incubare: per 120 min a 4°C su un agitatore oscillante		
- Aspirare e lavare : 3 x 1000 µl: 5 min a 4°C		
Coniugato HRPO	750 µl	750 µl
- Incubare: per 60 min a 4°C su un agitatore oscillante		
- Aspirare e lavare : 3 x 1000 µl di soluzione di lavaggio diluita: 5 min a 4°C		
- Aspirare e lavare : 1 x 1000 µl di acqua deionizzata: 5 min a 4°C		
Soluzione di substrato	750 µl	750 µl
- Incubare: per 10 minuti a temperatura ambiente su un agitatore oscillante		
- Aspirare la soluzione		

Canale del vassoio di incubazione	Controllo	Campioni
Acqua deionizzata	2000 µl	2000 µl
<ul style="list-style-type: none"> - Incubare: per 5 minuti a temperatura ambiente su un agitatore oscillante - Asciugare all'aria - Leggere (dopo 30 minuti) 		

9. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Interpretazione della striscia reattiva ALPHADOTS

L'interpretazione dei risultati si basa su un esame visivo:

- Considerare l'eventuale assenza di colorazione della membrana (laddove il controllo funzionale è in fase di reazione) come risultato negativo
- Considerare la visualizzazione sulla membrana di una o più macchie di colore (deposito blu con risposte a intensità variabile) come risultato positivo (+/++/+++).

L'intensità della reazione dell'area puntiforme è direttamente proporzionale alla quantità di autoanticorpi specifici presenti nel siero. All'aumento del livello di anticorpi, aumenta anche l'intensità dei punti; il solo esame visivo tuttavia non può distinguere le differenze tra l'intensità dei punti, che viene rappresentata come una funzione lineare.

È possibile apprezzare l'intensità della reazione come segue:

Positiva	+ /++/+++	Un punto distinto di colore blu facilmente visualizzabile; il risultato deve essere interpretato come positivo
Debolmente positiva	±	Il punto non è facilmente visualizzabile; il risultato deve essere interpretato come <i>borderline</i>
Negativa	-	Nessun punto visualizzabile; il risultato deve essere interpretato come negativo

Reazione debolmente positiva (±)

Con la maggior parte dei test di immunosierologia, le reazioni *borderline* e quelle di bassa intensità indicano livelli anticorpali minimi; risultano significativi solo i livelli anticorpali molto alti.

Alla diluizione finale d'uso (1/510), alcune aree che mostrano una reazione debole (±) potrebbero essere difficili da interpretare. Questo genere di reazione dovrà così essere considerata come *borderline*: in questo caso si suggerisce di rivalutare il campione a una diluizione minore (ad esempio diluizione finale: 1/250) per confermare o meno la sua positività.

Ad ogni modo, come per ogni tecnica dot blot è possibile osservare leggere variazioni delle intensità di colore tra i diversi dosaggi, in base a numerosi fattori (incubazioni, T°...): una reazione debolmente positiva (±) osservata la prima volta, potrebbe apparire in seguito come negativa (-) in un altro dosaggio.

Reazioni deboli potrebbero indicare bassi livelli di autoanticorpi o una reazione crociata con anticorpi non specifici, che sono riscontrabili nella normale popolazione dei pazienti (= autoanticorpi naturali⁸). In ambedue i casi, potrebbero venire riportati autoanticorpi a reazione debole (cioè di titolo più basso) che devono quindi essere interpretati con cautela, dal momento che un numero significativo di campioni normali presentano reazioni simili.

Controllo di qualità

Includere il controllo positivo in ogni dosaggio. La mancata osservanza dei requisiti del controllo di qualità invalida il test.

Controllo positivo: esempio di risultato

GANGLIO PROFILE	Controllo positivo	Interpretazione
Sulfatidi	●	+
GQ1b		-
GT1b	●	++
GT1a	●	++
GD3	●	+++
GD1b	●	+
GD1a	●	+++
GM3	●	+++
GM2		-
GM1	●	±
Contr Funz	●	+++

Controllo positivo

- Per l'interpretazione del risultato, fare riferimento al foglietto del Controllo di qualità incluso nel kit
- La risposta osservata per il controllo positivo può variare da batch a batch
- Le reazioni del controllo positivo possono essere leggermente più chiare o più scure a seconda delle condizioni di incubazione.
- **Il controllo positivo in dotazione con il kit non può, in ogni caso, essere considerato come una valutazione di cut-off dei campioni**

Controllo funzionale

- Il controllo funzionale presente sul fondo di ogni membrana deve mostrare una colorazione intensa (l'intensità del punto di controllo funzionale non deve essere utilizzata come calibratore)
- Il controllo funzionale garantisce che i reagenti disponibili nel kit siano attivi e che il dosaggio sia stato eseguito correttamente.
- Considerare il test come non valido e da ripetere se il punto di controllo funzionale non è visibile sulle strisce reattive.

10. REAZIONI CROCIATE⁷

	Struttura	Presente anche in:
Epitopo-GM1	Un galattosio a terminale libero associato β 1- 3 a N-acetil-galattosamina	GD1b
Epitopo-GM2	Una N-acteil-galattosamina a terminale libero associata β 1- 4 a galattosio	
Epitopo-GM3	Un galattosio terminale associato β 1-3 a glucosio e 2-3 a un residuo di acido sialico	GD1a, GT1b
Epitopi-GD1a	Un galattosio centrale associato α 2-3 a un residuo sialico	GM1, GM2, GT1a
	Un galattosio terminale associato α 2-3 a un residuo di acido sialico	GT1b
Epitopi-GD1b	Un galattosio centrale associato α 2-3 a 2 residui di acido sialico associati α 2,8	GT1b, GQ1b
Epitopo-GT1a	2 residui di acido sialico associati al galattosio terminale	
Epitopi-GQ1b	2 residui di acido sialico associati al galattosio terminale	GT1a
	2 residui di acido sialico associati al galattosio interno	GD1b

11. INDIVIDUAZIONE E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Sviluppo di colorazioni inattese:

- Alcuni campioni potrebbero presentare una colorazione scura di fondo della membrana. Queste reazioni non specifiche devono essere interpretate come negative
- Le strisce bagnate mostrano una colorazione di fondo scura. Questa colorazione svanisce una volta asciugate completamente. Esaminare esclusivamente le strisce asciutte (30 minuti).
- Tempo di incubazione e temperatura non adeguati
- Mancato controllo degli ingredienti dell'acqua
- Il substrato o la fiala utilizzata per la preparazione del substrato sono contaminati con sostanze ossidanti attive

Scarsa precisione:

- Campione non omogeneo una volta congelato
- Torbidità, particolato oppure contenuto altamente lipidico del campione
- Volumi non uguali aggiunti al canale
- Eliminazione inadeguata dei liquidi
- Lavaggio incompleto

Non lasciar asciugare le strisce nei canali. Collocarle su carta assorbente

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Tutti i kit ALPHADIA rappresentano un supporto diagnostico ma di per sé non sono prodotti diagnostici. I dati devono essere interpretati unitamente alle valutazioni cliniche o/e ad altri esiti di laboratorio.
- Non utilizzare il kit oltre la data di scadenza riportata sull'etichetta.
- Eseguire la procedura a 4°C. Una modifica di tale temperatura indurrà la perdita di sensibilità del dosaggio.

NEDERLANDS

IMMUNODOT ASSAY VOOR DE BEPALING VAN hlgG en hlgM OF hlg (G+M) AUTOANTILICHAMEN TEGEN GANGLIOSIDEN IN HUMAAN SERUM.

AD-GANGS12, AD-GANGS12 12 TESTEN
AD-GANGS-24 24 TESTEN

UITSLUITEND VOOR DIAGNOSTISCH GEBRUIK IN VITRO

1. KLINISCHE TOEPASSINGEN

Gangliosiden

Gangliosiden zijn sialzuurhoudende glycosfingolipiden die bestaan uit een lange keten alifatisch amine (ceramide), gehecht aan tussen één en vijf hexosen, waarvan ten minste één een sialyl moet zijn. De aanwezigheid van (een) sialzuurhoudende molecu(u)l(en), gehecht aan galactoserest(en) in de hexosekern, wordt gedefinieerd als glycosfingolipide als een ganglioside (1).

Gangliosiden bevinden zich in de buitenste laag van plasmamembranen en zijn in grote mate aanwezig in de myelineschede van de Schwann-cellen (perifeer zenuwstelsel) en van de oligodendrocyten (centraal zenuwstelsel) (2).

Neuropathie en anti-glycoconjugaat autoantilichamen

Het eerste klinische syndroom waarbij anti-glycoconjugaat autoantilichamen zijn beschreven, was de IgM paraproteïnemische neuropathie geassocieerd met anti-MAG autoantilichamen (1). Verdere onderzoeken brachten de aanwezigheid van perifere neuropathie en anti-glycolipiden autoantilichamen aan het licht, zoals anti-ganglioside of anti-MAG in een groot aantal perifere neuropathische aandoeningen (zie ook: 2 - 6). Daar waar men aanvankelijk sceptisch stond tegenover de significantie van anti-glycolipiden autoantilichamen, erkende men later dat deze autoantilichamen rechtstreeks kunnen bijdragen tot de pathogenese van neuropathie.

PROFIEL VAN GANGLIO Ab		
SULFATIDEN	→	SENSORISCHE DEMYELINISERENDE POLYNEUROPATHIE (IgM)
GQ1b	→	FISHER-SYNDROOM (IgG)
GT1b	→	CANOMAD (IgM)
GT1a	→	CERVICOBRACHIALE GROEP-B-STREPTOKOKKEN (IgG)
GD3	→	ATAXISCHE SENSORISCHE NEUROPATHIE - ACUUT (IgG) - CHRONISCH (IgM)
GD1b	→	
GD1a	→	MOTORISCHE NEUROPATHIE (IgM)
GM3	→	CANOMAD (IgM)
GM2	→	CHRONISCHE INFLAMMATOIRE DEMYELINISERENDE POLYNEUROPATHIE (IgG)
GM1	→	MULTIFOCALE MOTORISCHE NEUROPATHIE (IgM) AXONALE VORM VAN GROEP-B-STREPTOKOKKEN (ACUTE MOTORISCHE AXONALE NEUROPATHIE) (IgG)
Funcie-controle		

2. PRINCIPE VAN DE ASSAY

De ALPHADIA Ganglioprofile-kit bevat een kwalitatieve in vitro assay voor humane autoantilichamen (IgG, IgM of Ig G+M) tegen tien specifieke gangliosiden: sulfatiden, GQ1b, GT1b, GT1a, GD3, GD1b, GD1a, GM3, GM2 en GM1.

Tijdens de eerste incubatie reageren de in het verdunde serum aanwezige specifieke autoantilichamen met de dot ganglioside-membraanstrips. Vervolgens worden de strips gewassen om ongebonden antilichamen en andere serumverbindingen te verwijderen. Tijdens de tweede incubatie wordt een aan HRP gekoppeld anti-humaan antilichaam aan het traykanaal toegevoegd en dat reageert met het aan de membraanstrips geïmmobiliseerde humane IgG- en IgM-antilichaam. Na een volgende wasfase om ongebonden conjugaat te verwijderen, worden specifieke antilichamen opgespoord door te incuberen met de substraatoplossing.

3. REAGENTIA GELEVERD MET DE KIT

1. **Gecoate strips:** 12 of 24 membraanstrips gecoat met gangliosideantigenen. Bewaar ongebruikte membraanstrips bij 4°C, beschermd tegen vocht met een desiccanszakje.
2. **Positieve controle:** 1 microbuisje (30 µl) met positief serum. Bewaarmiddel: NaN₃ (< 0,1%).
3. **Enzymconjugaat:** 1 of 2 flacons (10 ml) met:
 - anti-hlgG geconjugeerd aan horseradish peroxidase (HRPO) voor AD-GANG12
 - anti-hlgM geconjugeerd aan horseradish peroxidase (HRPO) voor AD-GANG12
 - anti-hlg (G+M) geconjugeerd aan horseradish peroxidase (HRPO) voor AD-GANGS12 en AD-GANGS24Bewaarmiddel: neomycine. Klaar voor gebruik.
4. **Verdunningsvloeistof voor monster(s):** 1 of 2 flacons (32,5 ml) met buffer. Bewaarmiddel: NaN₃ (< 0,1%). Klaar voor gebruik.
5. **Wasbuffer:** 1 flacon (40 ml) met fosfaatbuffer met een detergens. Bewaarmiddel: thimerosal (< 0,1%). Vul de inhoud van de flacon met gedestilleerd water aan tot 400 ml (eindvolume). De verdunde wasoplossing blijft gedurende 1 maand houdbaar bij 4°C.
6. **Substraatoplossing:** 1 of 2 flacons (10 ml) met tetramethylbenzidine. Klaar voor gebruik.
7. **Incubatietry:** 1 of 2 x 12 kanalen.

4. VEREISTE MAAR NIET GELEVERDE MATERIALEN

- Regelbare, automatische micropipetten met wegwerptippen.
- Maatcilinder.
- Aspiratiepomp
- Gedestilleerd water
- Tuimelend schudapparaat.

5. WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

Om persoonlijke besmetting en besmetting van de omgeving te vermijden, dienen de volgende voorzorgsmaatregelen in acht te worden genomen:

- Gebruik wegwerphandschoenen als u met potentieel infectieus materiaal werkt en als u het assay uitvoert.
- Pipetteer de reagentia niet met de mond.
- Niet roken, eten, drinken of cosmetica aanbrengen tijdens het assay.
- Chromogen dient zorgvuldig te worden behandeld. Vermijd contact met de huid, ogen en slijmvliezen. Bij ongevallen dient grondig met stromend water te worden gespoeld.
- Alle materialen van menselijke oorsprong die voor de bereiding van deze kit worden gebruikt, gaven een negatief resultaat voor HbsAg, anti-HIV en anti-HCV. Aangezien op dit moment geen enkele test de volledige afwezigheid van deze virussen kan garanderen, dienen alle voor dit assay gebruikte monsters en reagentia als potentieel infectieus materiaal te worden beschouwd. Daarom dient

het afval naar aanleiding van de test te worden ontsmet en te worden weggegooid in overeenstemming met de vastgelegde veiligheidsprocedures. Ontvlambare wegwerpmaterialen moeten worden verbrand; niet-ontvlambare wegwerpmaterialen moeten gedurende ten minste 1 uur bij 121°C worden gesteriliseerd in een autoclaaf.

- Aan vloeibaar afval moet natriumhypochloriet met een eindconcentratie van 3% worden toegevoegd. Laat het hypochloriet gedurende ten minste 30 minuten werken. Vloeibaar afval dat een zuur bevat, moet met de desbetreffende hoeveelheid van een base worden geneutraliseerd alvorens te behandelen met natriumhypochloriet.
- Vermijd spatten en aerosolvorming. Indien er werd gemorst, dient er zorgvuldig met een oplossing van 3% natriumhypochloriet te worden gewassen en dient deze reinigingsvloeistof te worden weggegooid als zijnde potentieel infectieus afval.
- Sommige reagentia bevatten natriumazide als conserveermiddel. Om ophoping van explosieve metaalaziden in loden en koperen afvoerleidingen te vermijden, dienen reagentia te worden afgevoerd door de afvoerleidingen ruimschoots met water na te spoelen.

Om reproduceerbare resultaten te verkrijgen, moeten de volgende regels in acht worden genomen:

- Reagentia van verschillende charges of van andere leveranciers mogen niet worden gemengd
- Voor de juistheid van de resultaten is het aanbevolen om de incubatietijden en temperaturen strikt te volgen.
- **Laat de membraanstrips op kamertemperatuur komen alvorens het bewaarde buisje te openen.**
- **Laat de reagentia vóór gebruik niet bij kamertemperatuur staan; bewaar ze bij 4°C.**
- Gebruik de reagentia niet langer dan de aangegeven vervaldatum
- Onvolledig of inefficiënt wassen kan leiden tot een lage precisie en verhoogde achtergrond kleuring.
- Gebruik glaswerk, dat grondig werd gereinigd en niet gecontamineerd is met metaalionen of oxiderende bestanddelen.
- Gebruik gedestilleerd water, dat wordt bewaard in een propere verpakking.
- Vermijd besmettingen bij monsters onderling. Gebruik daarom wegwerptips voor elk monster en reagens
- Gebruik geen microbieel besmette stalen noch stalen waarin zich veel zichtbare partikels bevinden.
- Kruisbesmetting van reagentia of stalen kan vals negatieve resultaten veroorzaken. Gebruik een nieuwe, propere wegwerptip voor elke manipulatie van reagentia of stalen.
- Volg de exacte incubatietijden.
- Verschillende factoren kunnen de testperformance beïnvloeden. Bvb. De juistheid en herhaalbaarheid van de pipeteertechniek, afwijking van de voorgeschreven tijden.
- **Uitsluitend droge membraanstrips mogen worden beoordeeld.**

6. MONSTERNAME

Enkel een serummonster mag worden gebruikt. In hoge mate lipemische of gehemolyseerde monsters moeten worden afgevoerd. Bewaar monsters gedurende 1 dag bij 2 – 8°C. Indien de monsters gedurende langere tijd worden bewaard, verdient het aanbeveling ze in aliquots in te vriezen bij –20°C. De monsters herhaaldelijk invriezen en ontdooien dient te worden vermeden.

7. ASSAYPROCEDURE

OPGELET:

INCUBATIES MET SERUM EN CONJUGAAT MOETEN BIJ 4°C WORDEN UITGEVOERD.

Om condens op de strips te voorkomen, moeten de buisjes met het membraan worden geopend wanneer de strips op kamertemperatuur zijn.

Voorafgaande verdunning voor monster(s) en controle: 1:101

- Verdeel buisjes met een voorafgaande verdunning over het (de) monster(s) en de controle.
- Voeg 500 µl verdunningsvloeistof voor monster(s) toe.
- Pipetteer 5 µl van het (de) monster(s) en de controle.
- Meng de buisjes.

Procedure

- Pipetteer 1 ml van de verdunningsvloeistof voor monster(s), vul elk kanaal dat strips bevat en incubeer gedurende 10 minuten bij 4 °C met een tuimelend schudapparaat.
- Pipetteer 250 µl van het vooraf verdunde monster en de controle, en voeg ze toe aan het specifieke kanaal.
- Incubeer gedurende 120 minuten bij 4 °C met een tuimelend schudapparaat.
- Elimineer of aspireer de vloeistofvorm uit elk kanaal.
- Was de membraanstrips 3 keer gedurende 5 minuten bij 4 °C met 1 ml verdunde wasoplossing.
- Elimineer of aspireer de vloeistofvorm uit elk kanaal.
- Voeg 750 µl specifiek enzymconjugaat aan de incubatietray toe.
- Incubeer gedurende 60 minuten bij 4 °C met een tuimelend schudapparaat.
- Elimineer of aspireer de vloeistofvorm uit elk kanaal.
- Was de membraanstrips 3 keer gedurende 5 minuten met 1 ml verdunde wasoplossing.
- Was de membraanstrips 1 keer met 1 ml gedeïoniseerd water.
- Elimineer of aspireer de vloeistofvorm uit elk kanaal.
- Voeg 750 µl substraat-chromogeen-oplossing aan de incubatietray toe.
- Incubeer gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur met een tuimelend schudapparaat.
- Elimineer of aspireer de vloeistofvorm uit elk kanaal.
- Stop de reactie met 2 ml gedeïoniseerd water.
- Incubeer gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur met een tuimelend schudapparaat.
- Haal de strips uit de kanaaltjes
- Laat gedurende 30 min aan de lucht drogen en lees af.
- Fixeer de teststrips volgens het beoordelingsprotocol.

8. SCHEMA VAN DE ASSAY

Incubatie traykanaal	Controle	Monster(s)
Gecoate strip	1	1
Verdunningsvloeistof voor monster(s)	1000 µl	1000 µl
- Incubeer: 10 minuten bij 4°C met een tuimelend schudapparaat		
Vooraf verdund(e) monster(s)	----	250 µl
Vooraf verdunde positieve controle	250 µl	----
- Incubeer: 120 minuten bij 4°C met een tuimelend schudapparaat		
- Aspireer en was: 3 x 1000 µl verdunde wasoplossing: 5 minuten bij 4°C		
- Aspireer en was: 1 x 1000 µl gedeïoniseerd water : 5 minuten bij 4°C		

Incubatie traykanaal	Controle	Monster(s)
HRPO-conjugaat	750 µl	750 µl
- Incubeer: 60 minuten bij 4°C met een tuimelend schudapparaat		
- Aspireer en was: 3 x 1000 µl: 5 minuten bij 4°C		
Substraatoplossing	750 µl	750 µl
- Incubeer: 10 minuten bij kamertemperatuur met een tuimelend schudapparaat		
- Aspireer de oplossing		
Gedeïoniseerd water	2000 µl	2000 µl
- Incubeer: 5 minuten bij kamertemperatuur met een tuimelend schudapparaat		
- Aan lucht drogen		
- Aflezen (na 30 min)		

9. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Interpretatie van de ALPHADOTS-strip

De interpretatie van de resultaten bestaat uit een visueel onderzoek:

- Een eventuele afwezigheid van de kleuring van het membraan (terwijl de functionele controle wel een reactie vertoont) moet als een negatief resultaat worden beschouwd.
- Op het membraan verschijnen één of meerdere gekleurde vlekken (blauwe neerslag met verschillende intensiteitsreacties) die als een positief resultaat moeten worden beschouwd (+/+/+++).

De intensiteit van de dot-reactie is recht evenredig met de hoeveelheid specifieke autoantilichamen die in het serum aanwezig zijn. Naarmate het gehalte aan antilichamen stijgt, stijgt ook de dot-intensiteit. Een visueel onderzoek alleen kan echter geen onderscheid maken tussen de dot-intensiteit die als een lineaire functie relateert.

De intensiteit van de reactie kan als volgt worden beoordeeld:

Positief	+ /+/+++	Er kan gemakkelijk een blauw gekleurde, te onderscheiden dot worden waargenomen; het resultaat dient als positief te worden geïnterpreteerd.
Zwak positief	±	De dot is niet gemakkelijk waarneembaar; het resultaat dient als een grensgeval te worden geïnterpreteerd.
Negatief	-	Er is geen dot waarneembaar; het resultaat dient als negatief te worden geïnterpreteerd.

Zwak positieve reactie (±)

Bij de meeste immunoserologische bepalingen duiden grensgevallen en reacties met een lage intensiteit op een minimaal gehalte aan antilichamen; enkel de zeer hoge gehalten aan antilichamen zijn significant.

Bij de uiteindelijk gebruikte verdunning (1/510) is het mogelijk dat een aantal vlekken met een zwakke reactie (±) moeilijk te interpreteren zijn. Daarom moet dit soort reactie als een grensgeval worden beschouwd: in dit geval raden wij aan het monster bij een lagere verdunning opnieuw te beoordelen (bijvoorbeeld een uiteindelijke verdunning van 1/250) om de positiviteit ervan wel of niet te kunnen bevestigen.

Bij gelijk welke dot-blot-techniek kunnen er echter, afhankelijk van verschillende factoren (incubatie, T°, enz.), lichte variaties in kleuringsintensiteit tussen de verschillende runs worden waargenomen: een aanvankelijk zwak positieve reactie (±) kan later bij een andere run als een negatieve reactie (-) worden waargenomen.

Zwakke reacties kunnen ofwel op een laag gehalte aan autoantilichamen wijzen of op niet-specifieke kruisreagerende antilichamen die bij de normale patiëntenpopulatie (= natuurlijk voorkomende autoantilichamen^o) worden gevonden. In gelijk welk geval kan een zwak reagerend autoantilichaam (d.w.z. een lagere titer)

worden gemeld die met de nodige omzichtigheid moet worden geïnterpreteerd aangezien een significant aantal normale specimen een vergelijkbare reactie zal vertonen.

Kwaliteitscontrole

Bij elke run moet een positieve controle worden uitgevoerd. Indien de vereisten voor kwaliteitscontrole niet kunnen worden nageleefd, is de bepaling ongeldig.

Positieve controle: voorbeeld van een resultaat

GANGLIO PROFILE	Positieve controle	Interpretatie
Sulfatides	●	+
GQ1b		-
GT1b	●	++
GT1a	●	++
GD3	●	+++
GD1b	●	+
GD1a	●	+++
GM3	●	+++
GM2		-
GM1	●	±
Funct. contr.	●	+++

Positieve controle

- Raadpleeg het met de kit meegeleverde kwaliteitscontroleblad voor de interpretatie van het resultaat.
- De voor de positieve controle waargenomen reactie kan van lot tot lot variëren.
- De reacties van de positieve controle kunnen ofwel een beetje donkerder of een beetje lichter zijn, afhankelijk van de incubatiecondities.
- **De met de kit meegeleverde positieve controle kan in geen geval als een cut-off-beoordeling van de monsters worden beschouwd.**

Functionele controle

- De functionele controle die onderaan elk membraan aanwezig is, moet een intense kleuring vertonen (de intensiteit van de dot van de functionele controle mag niet als kalibrator worden gebruikt).
- De functionele controle garandeert dat de in de kit beschikbare reagentia actief zijn en dat de bepaling correct werd uitgevoerd.
- De test moet als ongeldig worden beschouwd en herhaald als de dot van de functionele controle niet zichtbaar is op de strips.

10. KRUISREACTIES ⁷

	Structuur	Ook aanwezig op:
GM1 – Epitop	Een terminale vrije galactose linkte β 1-3 aan N-acetyl-galactosamine	GD1b
GM2 - Epitop	Een terminale vrije N-acetyl-galactosamine linkte β 1-4 aan galactose	
GM3 - Epitop	Een terminale galactose linkte β 1-3 aan glucose en linkte α 2-3 aan een siaalzuurhoudend rest	GD1a, GT1b
GD1a – Epitopen	Een centrale galactose linkte α 2-3 aan een siaalrest	GM1, GM2, GT1a
	Een terminale galactose linkte α 2-3 aan een siaalzuurhoudend rest	GT1b
GD1b – Epitopen	Een centrale galactose linkte α 2-3 aan 2 siaalzuurhoudende resten en linkte α 2,8	GT1b, GQ1b
GT1a – Epitop	2 siaalzuurhoudende resten gelinkt aan de terminale galactose	
GQ1b - Epitopen	2 siaalzuurhoudende resten gelinkt aan de terminale galactose	GT1a
	2 siaalzuurhoudende resten gelinkt aan de interne galactose	GD1b

11. FOUTOPSPORING

Onverwachte kleurontwikkeling:

- Het is mogelijk dat een monster een donkere achtergrondkleuring van het membraan geeft. Deze specifieke reacties moeten als negatieve reacties worden geïnterpreteerd.
- De natte strips geven een donkere achtergrondkleur. Deze kleur verdwijnt nadat de strips volledig droog zijn. Uitsluitend droge membraanstrips (30 min) mogen worden beoordeeld.
- Incorrecte incubatietijd en -temperatuur.
- Waterkwaliteit niet gecontroleerd.
- Het substraat of de flacon, gebruikt om het substraat te bereiden, is besmet met oxiderende actieve bestanddelen

Slechte precisie:

- Niet-homogeen monster na invriezen.
- Troebelheid, deeltjes of hoog lipidengehalte van het monster.
- Ongelijke volumens aan het kanaal toegevoegd.
- Vloeistoffen onvoldoende geëlimineerd.
- Onvolledige wasfase.

Laat de strips tijdens het drogen niet in de kanaaltjes zitten. Leg ze op absorberende tissues.

12. BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE

- Alle ALPHADIA kits zijn een diagnostisch hulpmiddel en zijn zelf niet diagnostisch. De gegevens moeten samen met de klinische beoordeling en/of andere laboratoriumbevindingen worden geïnterpreteerd.
- De kit mag enkel tot de op het etiket van de kit vermelde houdbaarheidsdatum worden gebruikt.
- De procedure moet bij 4 °C worden uitgevoerd. Een andere temperatuur veroorzaakt een verlies aan gevoeligheid van de dosering.

PORTUGUÊS

ENSAIO IMUNODOT PARA DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS hIgG & hIgM OU hIg (G+M) CONTRA GANGLIOSÍDEOS EM SORO HUMANO.

AD-GANG12, AD-GANGS12 12 Determinações
AD-GANGS24 24 Determinações

SOMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

1. APLICAÇÕES CLÍNICAS

Gangliosídeos

Gangliosídeos são glicofingolípídeos contendo ácido siálico, compostos por uma cadeia longa de amina alifática (ceramida) anexada entre uma e cinco hexoses, e por último uma das quais deve ser sialitada. A presença da molécula(s) de ácido siálico anexada a resíduo(s) de galactose no núcleo hexose define um glicofingolípídeo como um gangliosídeo (1).

Gangliosídeos são localizados fora da membrana plasmática e são abundantes na bainha mielina das células de Schwann (sistema nervoso periférico) e de olidodendrócitos (sistema nervoso central) (2).

Neuropatia e anticorpos anti-Glicoconjugado

A primeira síndrome clínica, na qual o anticorpo anti-conjugado foi descrito, foi a Neuropatia Paraproteinêmica IgM associada com anticorpos anti-MAG (1). Estudos recentes revelaram a presença de Neuropatia Periférica e anticorpos anti-Glicolípídeos como anti-Gangliosídeo ou anti-MAG em larga porção de condições neuropáticas periféricas (para revisão 2-6). Inicialmente a significância sobre anticorpos anti-Glicolípídeos foi recolocada pelo reconhecimento que estes anticorpos podem contribuir diretamente para a patogênese da Neuropatia.

Perfil Ab GÂNGLIO		
SULFATIDAS	→	POLINEUROPATIA SENSORIA DEMIELINANTE (IgM)
GQ1b	→	SÍNDROME MILLER-FISHER (IgG)
GT1b	→	CANOMAD (IgM)
GT1a	→	CÉRVICO-BRAQUIAL GBS (IgG)
GD3	→	NEUROPATIA SENSÓRIA ATÁXICA
GD1b	→	- AGUDA (IgG) - CRÔNICA (IgM)
GD1a	→	NEUROPATIA MOTOR (IgM)
GM3	→	CANOMAD (IgM)
GM2	→	CIDP (IgG)
GM1	→	NEUROPATIA MOTOR MULTIFOCAL (IgM) FORMA AXONAL DE GBS (AMAN) (IgG)
Controle funcional		

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O kit Ganglioperfil ALPHADIA fornece um ensaio qualitativo in vitro para anticorpos humanos (IgG, IgM ou Ig G+M) contra dez específicos Gangliosídeos: sulfatidas, GQ1b, GT1b, GT1a, GD3, GD1b, GD1a, GM3, GM2 e GM1.

Durante o primeiro tempo de incubação, o anticorpo específico presente no soro diluído reage com a tira membrana de dot gangliosídeos. Estas tiras são então lavadas para remover anticorpos

não ligados e outros componentes do soros. Em um segundo tempo de incubação, um anticorpo anti-humano marcado com HRPO é adicionado a bandeja de canais e reage com o anticorpo humano IgG and IgM imobilizado nas tiras de membrana. Após nova lavagem para remover o conjugado não ligado, anticorpos específicos são revelados após incubação com solução substrato.

3. REAGENTES FORNECIDOS COM O KIT

- Tiras adsorvidas:** 12 ou 24 tiras membranas adsorvidas com antígenos gangliosídeos. Mantenha as tiras membranas não usadas a 4°C, protegidas da umidade na embalagem com dessecante.
- Controle Positivo :** 1 microtubo (30µl) de soro positivo
Preservativo : NaN₃ (<0,1%)
- Enzima conjugado :** 1 ou 2 tubos (10 ml) de:
 - anti-hIgG conjugado com peroxidase (HRPO), para AD-GANG12
 - anti-hIgM conjugado com peroxidase (HRPO), para AD-GANG12
 - anti - hIg (G+M) conjugado com peroxidase (HRPO), para AD-GANGS12 e AD-GANGS24Preservativo : Neomicina. Pronto para uso.
- Diluyente da amostra :** 1 ou 2 frascos (32,5 ml) de tampão.
Preservativo: NaN₃ (<0,1%). Pronto para uso.
- Tampão de lavagem :** 1 frasco (40 ml) de tampão fosfato com detergente. Preservativo: Timerosal (<0,1%). Pegue um frasco contendo 400 ml (final volume) com água destilada. A solução de lavagem diluída é estável por 1 mês a 4°C.
- Solução substrato :** 1 ou 2 frascos (10ml) de tetrametilbenzidina.
Pronto para uso.
- Bandeja de Incubação :** 1 ou 2 x 12 canais

4. MATERIAL REQUERIDO MAS NÃO FORNECIDO

- Micropipetas ajustáveis com ponteiros descartáveis
- Cilindro graduado
- Água destilada.
- Bomba de aspiração
- Agitador

5. AVISOS E PRECAUÇÕES

A fim de evitar contaminação pessoal e ambiental, as seguintes precauções devem ser observadas:

- use luvas descartáveis ao manusear material potencialmente infectado e ao executar o ensaio.
- não pipete reagentes com a boca.
- não fume, não coma, não beba e não aplique cosmético durante o ensaio
- o cromógeno e o reagente de bloqueio devem ser manuseado com cuidado. Evite contacto com pele, olhos e membranas mucosas. Em caso de acidente enxágüe completamente com água corrente.
- Todos os materiais de origem humana usados para a preparação deste kit foram negativos para HBsAg, anti-Anti-HIV e anti-HCV. Até o presente momento não existe nenhum teste que possa garantir a ausência completa destes vírus, portanto, todas as amostras e reagentes usados no ensaio devem ser considerados potencial infectados; conseqüentemente, os resíduos do ensaio devem ser descontaminados e descartados, de acordo com procedimentos de segurança estabelecidos. O material inflamável descartável deve ser incinerado; o material não inflamável descartável deve ser esterilizado em autoclave por pelo menos 1 hora a 121°C.
- os descartes líquidos devem ser colocados em solução de hipoclorito de sódio com uma concentração final de 3% . Deixar o hipoclorito agir por pelo menos 30 minutos. Os descartes líquidos que contêm ácidos devem ser neutralizados com quantidades apropriadas de base antes do tratamento com o hipoclorito de sódio.

- evite espirros e formação de aerossóis; em caso de derramamento, lave cuidadosamente com solução de hipoclorito de sódio a 3% e descarte este líquido como resíduo potencialmente contaminado.
- alguns reagentes contêm azida sódica como o preservativo; para prevenir a deposição de metais azidas explosivos nos encanamentos de chumbo e cobre, os reagentes devem ser descartados utilizando-se grandes quantidades de água.

A fim de obter resultados reproduzíveis, as seguintes regras devem ser observadas:

- não misture reagentes de lotes diferentes ou de outros fabricantes.
- para aderência estrita, tempo específico e temperatura de incubação são recomendados para resultados acuráseis.
- Permitir o que as tiras de membrana equilibrem-se a temperatura ambiente antes de abrir o tubo armazenado.
- Não permita que os reagentes equilibrem-se a temperatura ambiente antes do uso, mantenha-os a 4°C.
- não use reagentes depois de expirado o prazo de validade
- incompleta ou ineficiente lavagem poderá causar pouca precisão ou alto background.
- utilize vidraria completamente limpa, livre de contaminação com íons de metal ou de substâncias oxidativas.
- Utilize água destilada, armazenada em recipientes limpos.
- Evite qualquer contaminação entre amostras; para isto, ponteiros descartáveis devem ser usadas para cada amostra e reagente.
- soros contaminados ou amostras contendo partículas visíveis não devem ser usadas.
- contaminações cruzadas de reagentes ou amostras podem causar falsos resultados. Use ponteiros novas e limpas para cada amostra e reagente utilizado.
- não exponha o substrato a luz durante a incubação ou estocagem.
- Siga os tempos exatos de incubação.
- Uma variedade de fatores influenciam a performance do ensaio. Estes incluem acurácia e reprodutibilidade das técnicas de pipetagem, polarização do sincronismo durante o ensaio
- Somente tiras de membranas secas devem ser utilizadas.

6. COLETA DA AMOSTRA

É recomendado o uso de soro. Amostras altamente lipêmicas ou hemolizadas devem ser descartadas. Mantenha as amostras à 2-8°C por 1 dia; para períodos maiores é aconselhável alicotar a -20°C. Congelar e descongelar as amostras deve ser evitado.

7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

ATENÇÃO:

INCUBAÇÕES COM SORO E CONJUGADO DEVEM SER EXECUTADAS A 4°C.

Para prevenir a condensação das tiras, abra os tubos contendo a membrana quando as tiras atingirem a temperatura ambiente.

Pré diluição das amostra(s) e do controle: 1:101

- Coloque os tubos para amostra(s) e controle
- Adicione 500 µl do diluente da amostra
- Pipete 5 µl da amostra(s) e controle
- Inverta os tubos

Procedimento

- Pipete 1 ml do diluente da amostra, complete cada canal contendo as tiras e incube 10 min a 4°C no agitador
- Pipete 250 µl de amostra e controle pré diluídos e adicione então a o canal específico
- Incube por 120 minutos a 4°C no agitador

- Elimine ou aspire a forma líquida de cada canal.
- Lave as tiras membranas 3 vezes por 5min a 4°C com 1ml de solução de lavagem diluída.
- Elimine ou aspire a forma líquida de cada canal
- Adicione 750µl de Enzima Especifico Conjugado dentro da bandeja de incubação.
- Incube por 60 minutos a 4°C no agitador
- Elimine ou aspire a forma líquida de cada canal
- Lave as tiras 3 vezes por 5min com 1ml de solução de lavagem diluída
- Lave as tiras 1 vez com 1 ml de água deionizada
- Elimine ou aspire a forma líquida de cada canal
- Adicione 750µl de solução substrato-cromogênio dentro da bandeja de incubação
- Incube 10 min à temperatura ambiente em um agitador.
- Elimine ou aspire a forma líquida de cada canal
- Pare a reação com 2ml de água deionizada
- Incube 5 min à temperatura ambiente em um agitador.
- Remova as tiras dos canais.
- Deixe-as secar no ar por 30 minutos e leia.
- Fixe as membranas teste, para avaliação do protocolo.

8. ESQUEMA DO ENSAIO

Bandeja canal de Incubação	Controle	Amostra(s)
Tira adsorvida	1	1
Diluente da amostra	1000 µl	1000 µl
- Incube : 10 min a 4°C no agitador		
Amostras Pré diluídas	----	250 µl
Controle positivo pré diluído	250 µl	----
- Incube : 120 min a 4°C no agitador - Aspire e lave : 3 x 1000 µl : 5 min a 4°C		
HRPO conjugado	750 µl	750 µl
- Incube : 60 min a 4°C no agitador - Aspire e lave : 3 x 1000 µl de solução de lavagem diluída : 5 min a 4°C - Aspire e lave : 1 x 1000 µl de água deionizada : 5 min a 4°C		
Solução substrato	750 µl	750 µl
- Incube : 10 min a TA no agitador - Aspire a solução		
Água deionizada	2000 µl	2000 µl
- Incube : 5 min a TA no agitador - Ar seco - Leia após 30 minutos		

9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Interpretação da tira ALPHADOTS

A interpretação dos resultados consiste no exame visual:

- Ausência de coloração na membrana (visto que, o controle funcional está funcionando) deve ser considerado como *resultado negativo*
- Aparecimento na membrana de um ou vários pontos coloridos (depósitos azuis com respostas de várias intensidades) deve ser considerado como resultado positivo (+/+/+/+).

A intensidade da reação dot é diretamente proporcional à quantidade de autoanticorpos específicos presente no soro. Como os níveis de anticorpos aumentam, a intensidade do dot também aumentará, entretanto o exame visual sozinho não pode diferenciar entre a intensidade do dot, isso relaciona-se como uma função linear.

A intensidade da reação pode ser analisada a seguir:

Positivo	+ /++/+++	A coloração azul é facilmente visualizada; O resultado deve ser interpretado como positivo
Fracamente positivo	±	O dot não é facilmente visualizado; O resultado deve ser considerado como limite
Negativo	-	O dot não é visto; O resultado deve ser interpretado como negativo

Reação fracamente positiva (±)

Como na maioria dos ensaios imunoserológicos, reações limite ou de baixa intensidade indicam níveis mínimos de anticorpos, somente níveis muito altos de anticorpos são significantes.

Na diluição final de uso (1/510), alguns pontos mostrando uma fraca reação (±) podem dificultar a interpretação. Este tipo de reação será considerado como limite: neste caso nós recomendamos reavaliar a amostra em uma diluição mais baixa (como por exemplo diluição final: 1/250) a fim de confirmar ou não sua positividade.

Entretanto, como em qualquer técnica de dot, ligeiras variações de intensidades na coloração dependendo de diversos fatores (incubações, T°...), podem ser observados entre diferentes corridas: uma reação fraca positiva (±) observada no início, pode ser observada mais tarde como negativa (-) em uma outra corrida.

As reações fracas podem indicar baixos níveis de autoanticorpos ou reações cruzadas de anticorpos não específicos, que são encontrados na população de pacientes normais (= auto anticorpos naturais⁸). Em ambos os casos, autoanticorpos reagindo fracamente (isto é títulos mais baixos) podem ser relatados e devem ser interpretados com cuidado desde que um número significativo de espécimes normais tenham reações similares.

Controle de qualidade

O controle positivo deve ser incluído em cada corrida. Falha em encontrar os requerimentos do controle de qualidade invalidam o ensaio.

Controle positivo: exemplo de resultado

GANGLIO PROFILE	Controle positivo	Interpretação
Sulfatides	●	+
GQ1b		-
GT1b	●	++
GT1a	●	++
GD3	●	+++
GD1b	●	+
GD1a	●	+++
GM3	●	+++
GM2		-
GM1	●	±
Funct Ctl	●	+++

Controle positivo

- Para a interpretação do resultado, por favor, siga a bula de Controle de Qualidade incluída no kit.
- A resposta observada para o controle positivo pode diferenciar de grupo para grupo
- Reações de controle positivo podem ser estreitamente escuras ou claras dependendo das condições de incubação.
- **Controle positivo fornecido com o kit não pode, em nenhum caso, considerado como avaliação do ponto de corte das amostras.**

Controle Funcional

- O controle funciona presente na garrafa de cada membrana deve mostrar uma intensa coloração (a intensidade do controle funcional não deve ser usado como calibrador).
- O controle funcional assegura que os reagentes disponíveis no kit são ativos e que o ensaio foi executado corretamente.
- O teste deve ser considerado inválido e repetido, se o controle funcional não for visualizado nas tiras.

10. REAÇÕES CRUZADAS ⁷

	ESTRUTURA	Presente também em:
GM1 – Epítopo	Galactose terminal livre ligada β 1-3 a N-acetil - galactosamina	GD1b
GM2 - Epítopo	N-acetil – galactosamina terminal livre β 1-4 ligada a galactose	
GM3 - Epítopo	Galactose terminal ligada β 1-3 a glucose e ligada α 2-3 a resíduo de ácido siálico	GD1a, GT1b
GD1a – Epítopos	Galactose central ligada α 2-3 a resíduo siálico Galactose terminal ligada α 2-3 a resíduo de ácido siálico	GM1, GM2, GT1a GT1b
GD1b – Epítopos	Galactose central ligada α 2-3 a 2 resíduos de ácido siálico a α 2,8	GT1b, GQ1b
GT1a – Epítopo	2 resíduos de ácido siálico ligado a galactose terminal	
GQ1b – Epítopos	2 resíduos de ácido siálico ligados a galactose terminal 2 resíduos de ácido siálico ligados a galactose interna	GT1a GD1b

11. PROBLEMAS

Desenvolvimento de coloração inesperada

- Algumas amostras podem dar manchas escuras no fundo da membrana. Estas reações inespecíficas devem ser interpretadas como negativas.
- As tiras molhadas mostram um background escuro. Esta cor desaparece após as tiras secarem completamente. Somente tiras secas devem ser avaliadas (30 minutos).
- Inadequado tempo e temperatura de incubação
- Ingredientes na água sem controle
- Substrato ou frasco usado para preparo do substrato contendo substâncias ativas oxidantes.

Precisão baixa :

- Amostras não homogeneizadas após descongelamento.
- Amostras contendo turbidez, partículas e lipídeos.
- Volumes desiguais adicionados aos canais.
- Inadequada eliminação de fluídos
- Lavagens incompletas

Não deixe as tiras nos canais para secar. Coloque-as em um tecido absorvente.

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Todos os kits ALPHADIA são diagnósticos adicionais e por si só não são diagnósticos conclusivos. Os dados devem ser interpretados em conjunto com a avaliação clínica e/ou outros achados laboratoriais.
- O kit não deve ser usado após vencido o prazo de validade marcado na etiqueta..
- O procedimento deve ser realizado a 4°C. A modificação nesta temperatura induz a perda de sensibilidade da dosagem.

13. BIBLIOGRAPHIE-REFERENCES– BIBLIOGRAFIA BIBLIOΓΡΑΦΙΑ - BIBLIOGRAFIA - BIBLIOGRAFIE

1. Fredman, P. and A.Lekman. 1997. Glycosphingolipids as potential diagnostic markers and/or antigens in neurological disorders. *Neurochem. Res.* 22:1071-1083.
2. Willison, H.J. and N.Yuki. 2002. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 125:2591-2625.
3. Vincent, A., M.Roberts, H.Willison, B.Lang, and J.Newsom-Davis. 1995. Autoantibodies, neurotoxins and the nervous system. *J. Physiol Paris* 89:129-136.
4. Fredman, P. 1998. The role of antiglycolipid antibodies in neurological disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845:341-352.
5. Goffette, S., A.Jeanjean, F.Pierret, A.Peeters, and C.J.Sindic. 1998. Clinical relevance of the determination of anti-GQ1b antibodies in Miller Fisher and Guillain-Barre syndromes. *Acta Neurol. Belg.* 98:322-326.
6. Alaedini, A., H.W.Sander, A.P.Hays, and N.Latov. 2003. Antiganglioside antibodies in multifocal acquired sensory and motor neuropathy. *Arch. Neurol.* 60:42-46.
7. Humbel R.L., C.H.L. Luxembourg.
8. Caudie C, Vial C, Bancel J, Petiot P, Antoine JC, Gonnaud PM; Measurement of antiganglioside autoantibodies by immunodot-blot assay: clinical importance in peripheral neuropathies. *Ann Biol Clin.* 1999 Sep-Oct;57(5):579-88.