



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

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



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

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

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

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

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



ImmuBlot™

Anti-Myelin Associated Glycoproteins (anti-MAG) Western Blot Immunoassay

IVD

REF 1173

20 determinations

A Western Blot Immunoassay for the detection of antibodies to primarily anti-myelin associated glycoproteins (anti-MAG) and other glycolipid autoantibodies in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

Autoimmune responses of the peripheral nervous system, recognized as *peripheral neuropathies*, are manifestations associated with autoantibodies against various neural glycoconjugates. These neuropathies can be acute, chronic, involve axonal degeneration, or demyelination. Autoimmune neuropathies can be further divided into monoclonal gammopathies and polyclonal inflammatory polyneuropathies like Guillain-Barre syndrome, Chronic Inflammatory Demyelinated Polyneuropathy (CIDP), Multifocal Motor Neuropathy (MMN), and paraneoplastic neuropathies. In these diseases, there is a significant overlap of the involved auto-antigens which mediate the pathogenic mechanism. The following peripheral nerve specific autoantibodies are found in these neuropathies¹⁻⁶:

- a) anti-Myelin associated glycoprotein (MAG),
- b) anti-acidic glycolipids like sulfoglucoronyl paragloboside (SGPG),
- c) anti-gangliosides,
- d) anti-compact myelin associated proteins like P0, P2, and peripheral myelin protein 22 (PMP22).

The epitope (HNK1) recognized by the human MAG autoantibodies is a sulfated oligosaccharide. This same epitope is shared by SGPG, P0 and PMP22⁷. Neuropathies associated with anti-MAG with IgM paraproteinemia are usually a heterogenous disease group, slowly progressive with evidence of demyelination and a variable degree of axonal loss usually associated with gait ataxia. Of all peripheral neuropathy cases with IgM paraproteinemia, 50% possess anti-MAG antibodies⁸. It is perceived that these autoantibodies might interfere with the process of myelination, with myelin maintenance, or with axon-Schwann cell interactions. Hence, the detection of these autoantibodies is useful for the clinician, as it suggests active demyelination in a peripheral neuropathy.

The Western Blot immunoassay provides a sensitive method for the simultaneous screening and confirmation of autoantibodies against various nerve myelin associated antigens. Anti-MAG reactions can easily be observed at 100 kD. If the specimen yields no immunoreactivity on the blot strip, the result should be reported as negative.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

To perform the test, strips are incubated with diluted patient serum. Antibodies specifically bind to the myelin associated antigens on the strip. After proper washing and an incubation step with goat anti-human IgM conjugate, strips are washed and incubated with enzyme substrate. Anti-MAG antibody positive reactions appear as blue-violet bands at 100 kD.

REAGENTS

Storage and preparation

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

For technical assistance please contact:



or your local product distributor



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

Precautions

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

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. NaN₃ is toxic if ingested. Report incidents immediately to laboratory director or poison control center.

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

Materials provided

ImmuBlot™ anti-MAG Western Blot REF 1173

Kit contains sufficient reagents to perform 20 determinations.

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

* Contains < 0,1% NaN₃

Material required but not provided

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

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

PROCEDURE

Procedural Notes

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

Test Method

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

Quality Control

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

Positive Control Reaction: A dense and diffused blue-violet band will appear at 100 kD (indicated on control card with arrow), representing the anti-MAG reaction. A second band may appear directly below this band at 90 kD, representing degraded MAG (dMAG). The clinical relevance of dMAG is unknown. In addition the positive control strip will exhibit a blue 65 kD alignment marker (*refer to Figure 1*).

Negative Control Reaction: The negative control reaction will only exhibit the blue-violet 65 kD alignment marker (*refer to Figure 2*).

Figure 1

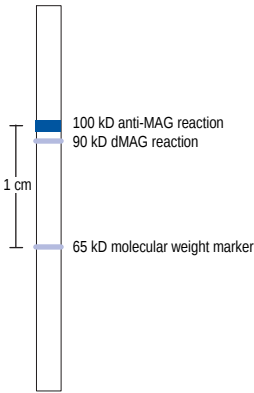
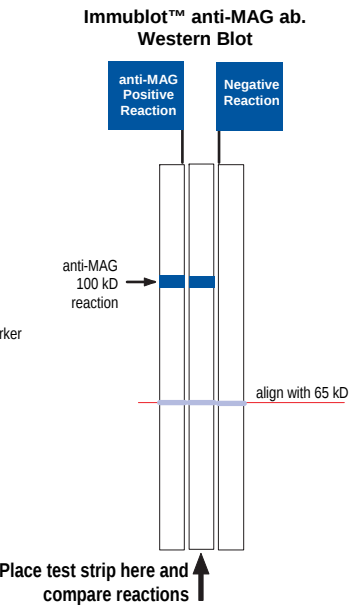


Figure 2



RESULTS

Reading and Interpretation Guidelines

The ImmuBlot™ strips contain myelin associated glycoproteins of 100 kD molecular weight. The 65 kD protein serves as a molecular weight marker to help align the strips on the control card (refer to Figure 1).

- Step 1.** Hold test specimen strip between the positive and negative control strips on the provided, laminated Control Card and align test strip using the 65 kD molecular weight marker as the reference point (refer to Figure 2).
- Step 2.** Compare reaction of test strip with those of the controls on either side.
- Step 3.** If the band on the test strip aligns with the 100 kD band on the positive control strip it is an anti-MAG reaction. Such a reaction should be considered positive. Positive reactions can also occur in varying intensities, from weak to strong. Weak reactions should be compared with baseline reaction intensities at the corresponding position on the negative control strip. Figure 2 provides an example of a properly aligned positive result.
- Step 4.** If there are no reaction bands visible and/or bands not corresponding to the 100 kD anti-MAG reaction of the control card these results should be considered anti-MAG negative.

REFERENCES • REFERENCIAS • LITERATUR • RIFERIMENTI

1. Quarles RH, and Weiss MD. Autoantibodies associated with peripheral neuropathy. Muscle & Nerve; 22:800-822, 1999.
2. Griffin J. Antiglycolipid antibodies and peripheral neuropathies:links to pathogenesis. Prog Brain Res; 101: 313-323, 1994.
3. Quarles RH. Glycoproteins of the myelin sheaths. J. Mol. Neurosci; 8:1-12, 1997.
4. Kanda T, Yoshino H, Ariga T et al. Glycosphingolipid antigens in cultured bovine brain microvascular endothelial cells: Sulfoglucuronosyl paragloboside as a target of monoclonal IgM in demyelinating neuropathy. J. Cell Biol; 126:235-246, 1994.
5. Hammer JA, O'Shannessy DJ, and De LM et. al. Immunoreactivity of PMP-22, P0, and other 19 to 28kDa glycoproteins in peripheral nerve myelin of mammals and fish with HNK1 and related antibodies. J. Neurosci Res; 35:546-558, 1993.
6. Baba H, Daune GC, Ilyas AA et. al. anti-GM1 ganglioside antibodies with differing fine specificities in patients with multifocal motor neuropathy. J. Neuroimmunol; 25:143-150, 1989.
7. Field MC, Wing DR, Dwek RA et. al. Detection of multisulfated N-linked glycans in the L2/HNK1 carbohydrate epitope expressing neural adhesion molecule P0. J. Neurochem; 58:993-1000, 1992.
8. Latov N. Pathogenesis and therapy of neuropathies associated with monoclonal gammopathies. Ann. Neurol; 37:S32-S42, 1995.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control, National Institute for Health. (HHS Pub. No {CDC} 93-8395) 1993.
10. Chassande B, Leger JM, Younes-Chennoufi AB et al. Peripheral neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy: Correlations between M-Protein antibody activity and clinical/electrophysiological features in 40 cases. Mus and Nerve; 55-62, 1998.
11. Meucci M, Baldini L, Cappellari A et al. Anti-Myelin associated glycoprotein antibodies predict the development of neuropathy in asymptomatic patients with IgM monoclonal gammopathy. Ann Neurol; 46:119-122, 1999.

VALEURS ATTENDUES

Incidence d'un anticorps anti-nerf (anti-MAG) dans les neuropathies¹⁰

Trouble	n	positif	% positif
Polyneuropathie Gammopathie IgM	40	26	65
Neuropathies démýélisantes	33	26	78
Neuropathie axonale	6	0	0

Association des titres anticorps anti-MAG avec la progression de la neuropathie clinique¹¹

anti-MAG Titre	pas de neuropathie n=17	sous-clinique n=7	clinique confirmée n=6
Élevée de 1:25 000 000 à 1:100 000	1	3	3
Faible de 1:6 400 à 1:200	6	2	1
Négatif <1:10	10	2	2

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Le Western-Blot anticorps anti-MAG d'ImmuBlot™ doit être utilisé comme une aide au diagnostic. Les résultats positifs peuvent être trouvés dans d'autres conditions auto-immunes et/ou certaines maladies infectieuses. Ainsi les résultats doivent être évalués et interprétés par le clinicien ou le neurologue en fonction de l'historique clinique du patient et des autres résultats de laboratoire. Certains sangs peuvent réagir occasionnellement au marqueur MW. L'importance de cette réaction est inconnue.

GUIDE DE DÉPANNAGE

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

EXPECTED VALUES

Incidence of anti-Nerve (anti-MAG) Antibodies in Neuropathies¹⁰

Disorder	n	positive	% positive
Polyneuropathy IgM gammopathy	40	26	65
Demyelinating neuropathies	33	26	78
Axonal neuropathy	6	0	0

Association of anti-MAG Antibody Titers with Progression to Clinical Neuropathy¹¹

anti-MAG Titer	no neuropathy n=17	subclinical n=7	confirmed clinical n=6
High 1:25,000,000 to 1:100,000	1	3	3
Low 1:6,400 to 1:200	6	2	1
Negative <1:10	10	2	2

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The ImmuBlot™ anti-MAG antibody Western Blot should be used as an aid to diagnosis. Positive results may be found in other autoimmune conditions and/or certain infectious diseases. Hence results should be evaluated and interpreted by the clinician or neurologist in light of the patient's clinical history and other laboratory findings. Some sera may react to the MW marker occasionally, the significance of which is not known.

TROUBLESHOOTING GUIDE

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



ImmuBlot™

Anticorpi Anti-Glicoproteina Associati alla Mielina (anti-MAG) Test Western Blot

[IVD]

[REF] 1173

20 Determinazioni

USO PREVISTO

Test Western Blot per la determinazione degli anticorpi diretti contro glicoproteine associate alla mielina (anti-MAG) ed altri autoanticorpi glicolipidici nel siero umano.

RIEPILOGO

Le risposte autoimmuni del sistema nervoso periferico, conosciute come *neuropatie periferiche*, sono manifestazioni associate ad autoanticorpi diretti contro vari glicoconjugati neurali. Queste neuropatie possono essere acute o croniche, e possono comportare una degenerazione assonale o una demielinizzazione. Le neuropatie autoimmuni si possono ulteriormente dividere in gammopatie monoclonali e polineuropatie infiammatorie policlonali, quali la sindrome di Guillain-Barré, la *Polineuropatia Demielizzata Infiammatoria Cronica* (CIDP), la *Neuropatia Motoria Multifocale* (MMN), e le *neuropatie paraneoplastiche*. In queste malattie si verifica una significativa sovrapposizione degli autoantigeni coinvolti, che modificano il meccanismo patogeno. Di seguito sono elencati gli anticorpi diretti contro specifici componenti del nervo periferico trovati in tutte queste neuropatie¹⁻⁶:

- a) anti-glicoproteina associata alla mielina (MAG),
- b) anti-glicolipidi come il solfo-glucuronil paragloboside (SGPG),
- c) anti-gangliosidi
- d) anti-proteine associate alla mielina compatta come la P0, la P2, e la proteina mielinica periferica 22 (PMP22).

L'epitopo (HNK1) riconosciuto dagli autoanticorpi anti-MAG umani è l'oligosaccaride solfato. Questo stesso epitopo è condiviso da SGPG, P0 e PMP22⁷. Le neuropatie associate agli anti-MAG con paraproteinemia IgM fanno parte di un gruppo molto eterogeneo, con decorso lento, tracce di demielinizzazione e un grado variabile di perdita assonale, generalmente collegata a un'atassia dell'equilibrio. Di tutti i casi di neuropatie periferiche con paraproteinemia IgM, il 50% presenta anticorpi anti-MAG⁸. Sembra che questi autoanticorpi possano interferire con il processo di mielinizzazione, con la conservazione della mielina o con le interazioni assone-cellula di Schwann. Pertanto, l'identificazione di questi autoanticorpi è utile per il medico, in quanto indice di una demielinizzazione attiva in corso in una neuropatia periferica.

Il Test Western Blot è un metodo sensibile che permette di procedere contemporaneamente allo screening e alla conferma di autoanticorpi diretti contro vari antigeni del nervo associati alla mielina. Le reazioni anti-MAG si possono osservare a 100 kD. Se il campione non reagisce alla striscia, il risultato deve considerarsi negativo.

PRINCIPIO DEL METODO

Per eseguire il test, le strisce vengono incubate con siero diluito del paziente. Gli anticorpi si legano specificamente agli antigeni associati alla mielina presenti sulla striscia. Dopo lavaggio accurato e incubazione con coniugato anti-IgM umane di capra, le strisce vengono lavate e incubate con substrato enzimatico. La comparsa di bande di colore blu-violetto a 100 kD sta ad indicare che la reazione è positiva agli anticorpi anti-MAG.

REAGENTI

Condizioni di conservazione

Immagazzinare tutti i reagenti a 2-8° C. **Non congelare.** Non usare, se i reagenti liquidi sono torbidi o un precipitato è presente. Prima dell'iniziare l'analisi, i reagenti devono essere equilibrati alla temperatura

Réaction de contrôle positif : Une bande bleu-violet dense et diffuse apparaît à 100 kD (indiquée sur la carte de contrôle avec une flèche), représentant la réaction anti-MAG. Une deuxième bande peut apparaître directement en dessous de cette bande à 90 kD, représentant un MAG dégradée (dMAG). L'intérêt clinique de dMAG est inconnu. De plus, le buvard de contrôle positif présentera un marqueur d'alignement bleu à 65 kD (se reporter à la Figure 1).

Réaction de contrôle négatif : La réaction de contrôle négatif ne présentera qu'un marqueur d'alignement bleu-violet à 65 kD (se reporter à la Figure 2).

Figure 1

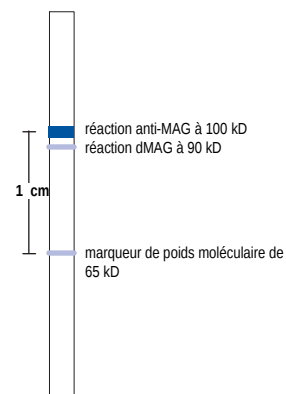
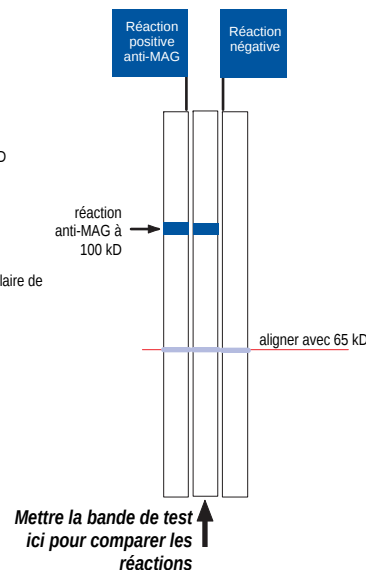


Figure 2

Western-Blot anticorps anti-MAG d'ImmuBlot™



RÉSULTATS

Conseils de lecture et d'interprétation

Les bandes d'ImmuBlot™ contiennent des glycoprotéines associées à la myéline d'un poids moléculaire de 100 kD. La protéine à 65 kD sert de marqueur de poids moléculaire pour aider à aligner les bandes sur la carte de contrôle (se reporter à la Figure 1).

- Tenir le buvard de l'échantillon testé entre les buvards de contrôle négatif et positif sur la carte de contrôle plastifiée fournie et aligner la bande de test en utilisant le marqueur de poids moléculaire à 65 kD comme point de référence (se reporter à la Figure 2).
- Comparer la réaction du buvard de test avec celle des contrôles de chaque côté.
- Si la bande sur le buvard de test s'aligne avec la bande des 100 kD du buvard du contrôle positif, il s'agit d'une réaction anti-MAG. Une telle réaction doit être considérée comme positive. Les réactions positives peuvent aussi se produire avec des intensités variées, allant d'une faible intensité à une forte intensité. Les réactions faibles doivent être comparées avec la ligne de base des intensités de réaction à la position correspondante sur le buvard de contrôle négatif. La Figure 2 fournit un exemple de résultat positif correctement aligné.
- S'il n'existe aucune bande de réaction visible et/ou aucune bande correspondant à une réaction anti-MAG à 100 kD sur la carte de contrôle, ces résultats doivent être considérés comme une réaction anti-MAG négative.

PT

- des têtes de pipettes jetables
- un compte-minutes

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

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

PROCÉDURE

Notes de procédure

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

Méthode de test

- Etape 1** En utilisant des forceps émoussés, mettre le nombre de **bandes** nécessaires avec l'étiquette sur le dessus dans les puits individuels du plateau d'essai.
- Etape 2** Verser **1,0 ml** à la pipette de diluant de sang dans chaque puits.
- Etape 3** Verser **10 µl** de contrôles négatif et positif et d'échantillon du patient dans les puits appropriés afin d'obtenir une dilution de **1:101e**. Incuber pendant **60 minutes** (±5 min) à température ambiante sur un mélangeur ou un secoueur tournant.
- Etape 4** Aspirer la solution d'échantillon dans un bac à déchets. Nettoyer soigneusement les bandes avec le tampon de lavage en faisant gicler environ 2 ml de solution directement sur les bandes. Laver les bandes avec une légère agitation pendant **5 minutes** et aspirer la solution dans un bac à déchets. **Répéter 2x**. *Précaution : Compléter le lavage des bandes entre les incubations est crucial à l'obtention des résultats valides. Un lavage incorrect entraînera une coloration élevée de l'arrière-plan.*
- Etape 5** Verser **1,0 ml** à la pipette de diluant de sang suivi de **10 µl** de conjugué dans chaque puits. Incuber pendant **30 minutes** (±5 min) à température ambiante sur un mélangeur ou un secoueur tournant.
- Etape 6** Répéter l'étape 4.
- Etape 7** Verser **1,0 ml** à la pipette de substrat dans chaque puits et incuber en remuant légèrement pendant **10 minutes** (±5 min) à température ambiante et à lumière réduite.
- Etape 8** Laver soigneusement les bandes avec de l'eau désionisée en faisant gicler environ 2 ml de solution directement sur les bandes. Laver les bandes avec une légère agitation pendant **5 minutes** et aspirer l'eau dans un bac à déchets. **Répéter**.
- Etape 9** À l'aide de forceps émoussés, retirer les bandes du plateau à essai et les mettre délicatement sur du papier absorbant. Ne manipuler les bandes que par leurs extrémités et les laisser sécher entre **15 et 20 minutes**.

Contrôle de la qualité

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

IT

ambiente (~22°). Le strisce dell'antigene possono essere usate soltanto una volta. Non interscambiare i componenti dei lotti differenti. Non usare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sulle etichette.

Precauzioni

Tutte le fonti umane di materiali usati nella preparazione dei controlli per questo prodotto sono state testate e sono risultate negative per la presenza di anticorpi anti-HIV, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV mediante metodi approvati dall'FDA. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

La sodio azide è usata come conservante. La sodio azide è un veleno e può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Lasciar scorrere grandi quantità di acqua, se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, per prevenire la formazione di azidi.

La sostituzione di componenti diversi da quelli forniti nel kit può causare risultati non attendibili. Usare le buone tecniche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare dopo la data di scadenza.

Materiali forniti

ImmuBlot™ anti-MAG Western Blot REF 1173

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 20 determinazioni ciascuno.

- | | |
|-------------------|---|
| 1 x 20 | strisce anti-MAG Western Blot |
| 1 x 120 µl | *controllo positivo, pronto al uso (<i>protezione viola</i>) |
| 1 x 120 µl | *controllo negativo, pronto al uso (<i>protezione gialla</i>) |
| 1 | scheda di controllo |
| 1 x 250 µl | *coniugato IgM capra anti-umana (<i>protezione blu</i>) |
| 1 x 60 ml | *diluyente per campioni |
| 1 x 25 ml | *substrato enzimatico |
| 1 fiala | *tampone di lavaggio per 1 litro/fiala |
| 3 | bagni di analisi |
| 2 | documentazione |

* Contains < 0,1% NaN₃

Materiali Richiesti Ma Non forniti

- Pulire il cilindro 1000 ml
- Forcipe Non-seghettato
- Attuatore o agitatore di rotazione della piattaforma
- Carta assorbente o tovaglioli di carta
- Deionizzato o acqua distillata
- Bottiglia di compressione all'amplificatore della lavata diluito stretta
- Pipette capaci di trasporti del 10 – 1000 µl
- A gettare pipettare le punte
- Temporizzatore

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Soltanto gli esemplari del siero dovrebbero essere usati in questa procedura. Grossolanamente emolizzati, gli esemplari lipemici o da microbi contaminati possono interferire con le prestazioni della prova e non dovrebbero essere usati. Immagazzinare gli esemplari a 2-8° C per più che una settimana. Per immagazzinaggio più di lunga durata, gli esemplari del siero dovrebbero essere congelati. Evitare il congelamento e lo scioglimento ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

Note di Procedura

- Leggere attentamente la Metodica prima di procedere con il test.
- Lasciare che i campioni di siero e i reagenti raggiungano la temperatura ambiente per ~30 minuti prima di eseguire il test. Riporre tutti i campioni e i reagenti non utilizzati nel frigorifero immediatamente dopo l'uso.
- Una corretta tecnica di lavaggio è fondamentale per ottenere prestazioni soddisfacenti del test.
- Maneggiare le strisce reattive solo con pinze pulite. Non toccarle con mani nude.
- Le strisce sono numerate singolarmente, at the bottom of each strip. Assegnare ai campioni dei numeri di identificazione corrispondenti alle relative strisce e annotarli nel Report.
- Compilare il Report con altre eventuali informazioni importanti prima di eseguire il test.

Metodica d'Analisi

1. Utilizzare pinze con punte arrotondate, porre il numero necessario di **Strisce** etichettate nei singoli pozzetti della vaschetta.
2. Pipettare **1,0 ml** di Diluente di Siero in ciascun pozzetto.
3. Pipettare **10 ul** di Controllo Positivo e Negativo e di campione nei pozzetti appropriati per ottenere una **diluizione 1:101**. Incubare per **60 minuti** (±5 min.) a temperatura ambiente su un agitatore oscillante o rotante.
4. Aspirare la soluzione del campione in un contenitore di rifiuti. Lavare accuratamente le strisce con del Tampone di Lavaggio spruzzando circa 2ml di soluzione direttamente sulle strisce. Lavare le strisce scuotendole lievemente per **5 minuti** e aspirare la soluzione in un contenitore di rifiuti. **Ripetere 2x. Attenzione: Un lavaggio completo delle strisce tra un'incubazione e l'altra è fondamentale per ottenere risultati validi. Un lavaggio non adeguato darà origine a un'intensa colorazione di fondo.**
5. Pipettare **1,0 ml** di Diluente di Siero e **10 ul** di Coniugato in ciascun pozzetto. Incubare per **30 minuti** (±5 min) a temperatura ambiente su un agitatore oscillante o rotante.
6. Ripetere il **Punto 4**.
7. Pipettare **1,0 ml** di Substrato in ciascun pozzetto e incubare a temperatura ambiente per **10 minuti** (±5 min) scuotendoli delicatamente e ponendoli lontano dalla luce.
8. Lavare accuratamente le strisce con l'acqua deionizzata spruzzando circa 2ml di acqua direttamente sulle strisce. Lavare le strisce scuotendole lievemente per **5 minuti** e aspirare l'acqua in un contenitore di rifiuti. **Ripetere.**
9. Utilizzare pinze con punte arrotondate, togliere le strisce dalla vaschetta e porle delicatamente su della carta assorbente. Maneggiare le strisce solo alla loro estremità e lasciarle asciugare per **15-20 minuti**.

Controllo di Qualité

Nonostante le card di controllo siano molto specifiche, in ciascuna seduta è necessario utilizzare anche i controlli positivi e negativi per assicurare una prestazione corretta del test.

Reazione del Controllo Positivo: Compare a 100 kD (indicate sulla scheda di controllo con la freccia) una banda di colore blu-violetto compatta e diffusa, che rappresenta la reazione anti-MAG. Una seconda banda può comparire direttamente sotto questa fascia a kD 90, rappresentante il MAG degradato

RÉACTIFS

Stockage et préparation

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

Précautions

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

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

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

Matériaux fournis

Western-Blot anti-MAG d'ImmuBlot™ REF 1173

Le kit contient suffisamment de réactifs pour effectuer 40 mesures.

1 x 20	Bandes de buvard Western-Blot
1 x 120 µl	* Contrôle positif anti-MAG (<i>fiOLE au capuchon violet</i>)
1 x 120 µl	*Contrôle négatif (<i>fiOLE au capuchon jaune</i>).
1	Carte de contrôle
1 x 250 µl	* Conjugué IgM anti-humain de chèvre (<i>fiOLE au capuchon bleu</i>)
1 x 60 ml	* Diluant du sang
1 x 25 ml	Substrat enzymatique (<i>bouteille ambrée</i>)
1 fiole	* Tampon de lavage en poudre ; à reconstituer à un litre avec de l'eau désionisée ou distillée.
3	Plateaux d'essais
2	Formulaires de rapport <i>* Contient < 0,1 % NaN₃</i>

Matériaux nécessaires, mais non fournis

- un cylindre gradué de 1000 ml propre
- des forceps non dentelés (forceps à filtre)
- un mélangeur ou secoueur à plateforme rotative
- du papier absorbant ou des serviettes en papier
- de l'eau déminéralisée ou distillée
- une pissette en plastique pour contenir le tampon de lavage dilué
- des pipettes capables de délivrer de 10 à 1000 µl



ImmuBlot™

Immunoessai Western-Blot des anti-glycoprotéine associée à la myéline (anti-MAG)

IVD

REF 1173 20 mesures

Un immunoessai Western-Blot pour la détection des anticorps associés principalement aux anti-glycoprotéines associées à la myéline (anti-MAG) et autres auto-anticorps glycolipides dans le sang humain.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les réponses auto-immunes des systèmes nerveux périphériques, reconnus comme des *neuropathies périphériques* sont des manifestations associées aux auto-anticorps contre divers conjugués glycolipiques neurax. Ces neuropathies peuvent être aiguës, chroniques, impliquer une dégénérescence axonale ou une démyélination. Les neuropathies auto-immunes peuvent encore être divisées en gammopathies monoclonales et en polyneuropathies inflammatoires polyclonales comme le syndrome de Guillain-Barre, la polyneuropathie démyélinisante inflammatoire chronique (CIDP), la neuropathie moteur multifocale (MMN) et les neuropathies paraneoplasiques. Dans ces maladies, il y a des chevauchements importants des auto-antigènes impliqués qui modèrent le mécanisme pathogénique. Les auto-anticorps spécifiques des nerfs périphériques suivants sont trouvés dans ces neuropathies¹⁻⁶ :

- a) l'anti-glycoprotéine associée à la myéline (MAG),
- b) les glycolipides anti-acidiques tels que le sulfo-glucuronyl-paragloboside (SGPG),
- c) les anti-gangliosides,
- d) les anti-protéines associées à la myéline compacte comme P0, P2 et la protéine périphérique de la myéline 22 (PMP22).

L'épitope (HNK1) reconnue par les auto-anticorps MAG humains est un oligosaccharide sulfaté. Le même épitope est partagé par SGPG, P0 et PMP22⁷. Les neuropathies associées avec anti-MAG impliquant des paraprotéinémies IgM sont généralement un groupe de maladies hétérogène, progressant lentement avec évidence de démyélination et un degré variable de perte axonale généralement associée à une ataxie locomotrice. De tous les cas de neuropathie périphérique avec paraprotéinémie IgM, 50 % possèdent des anticorps anti-MAG⁸. Il est perçu que ces auto-anticorps peuvent interférer avec la procédure de myélination, avec l'entretien de la myéline ou avec les interactions entre les cellules de Schwann et les fibres nerveuses. Ainsi, la détection de ces auto-anticorps est utile pour le clinicien, car elle suggère une démyélination active dans une neuropathie périphérique.

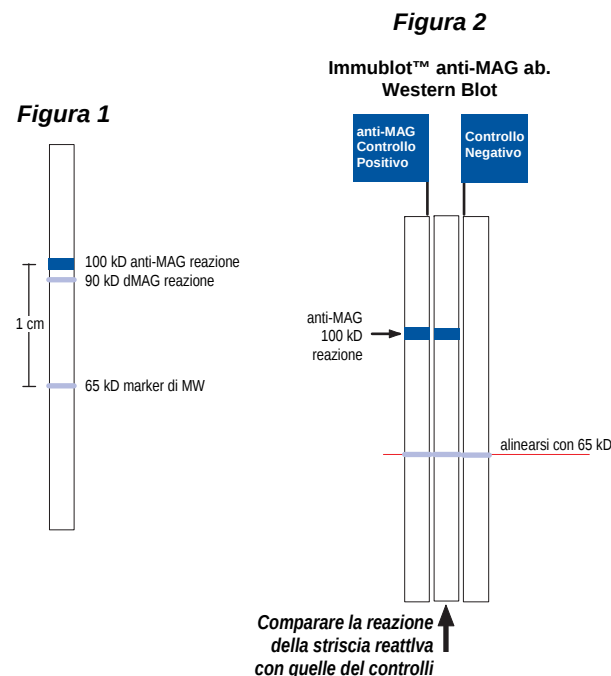
L'immunoessai Western-Blot fournit une méthode sensible pour le dépistage simultané et la confirmation des auto-anticorps contre divers antigènes associés à la myéline des nerfs. Les réactions anti-MAG peuvent facilement être observées à 100 kD. Si l'échantillon ne donne aucune immunoréactivité sur le buvard, le résultat doit être rapporté comme étant négatif.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Pour effectuer un test, les bandes sont incubées avec le sang dilué du patient. Les anticorps spécifiquement liés à la myéline associée aux antigènes sur le buvard. Après un lavage correct et une étape d'incubation avec le conjugué IgM anti-humain de chèvre, les bandes sont lavées et incubées avec le substrat enzymique. Les réactions positives anticorps d'anti-MAG apparaissent comme des bandes bleu-violet à 100 kD.

(dMAG). L'attinenza clinica di dMAG é sconosciuta. Inoltre, la striscia del controllo positivo sviluppa il marker per l'allineamento di 65 kD di colore blu (vedi Figura 1).

Reazione del Controllo Negativo: La striscia del controllo negativo mostra solo il marker per l'allineamento di 65 kD di colore blu-violetto (vedi Figura 2).



RISULTATI

Linee Guida per la Lettura e l'Interpretazione

Le strisce ImmuBlot™ contengono glicoproteine associate alla mielina di peso molecolare 100 kD. La proteina di pm 65 kD funge da marker di peso molecolare in modo da favorire l'allineamento delle strisce sulla card di controllo (vedi Figura 1).

1. Tenere la striscia campione tra le strisce dei controlli positivo e negativo sulla card di controllo laminata fornita e allinearla utilizzando il marker di peso molecolare 35 kD come punto di riferimento (vedi Figura 2).
2. Comparare la reazione della striscia reattiva con quelle dei controlli su entrambi i lati.
3. Se la banda sulla striscia reattiva si allinea alla banda di 100 kD sulla striscia del controllo positivo, si tratta di una reazione anti-MAG. Tale reazione deve considerarsi positiva. Le reazioni positive possono manifestarsi con varie intensità, da quella debole a quella più forte. Le reazioni deboli devono essere comparate con le intensità base nella corrispondente posizione sulla striscia del controllo negativo. La Figura 2 fornisce un esempio di un risultato positivo allineato correttamente.
4. Se non sono visibili bande reattive e/o bande non corrispondenti alla reazione anti-MAG di 100 kD della card di controllo, i risultati devono considerarsi negativi al test anti-MAG.

VALORI ATTESI

Incidenza di Anticorpi of anti-MAG nelle Neuropatie¹⁰

Malattia	n	positivi	% positivi
Polineuropatia+ Gammopatia IgM	40	26	65
Neuropatie Demyelinizzante	33	26	78
Neuropatia Assonale	6	0	0

Associazione dei Titoli degli Anticorpi anti-MAG con Progressione verso Neuropatia Clinica¹¹

anti-MAG Titer	nessuna neuropatia n=17	subclinica n=7	confermata clinica n=6
Alto 1:25,000,000 a	1	3	3
1:100,000 Basso 1:6,400 a	6	2	1
1:200 Negativo <1:10	10	2	2

LIMITI DELLA PROCEDURA

Il Test Western Blot ImmuBlot™ per gli anticorpi anti-MAG deve essere utilizzato quale ausilio nella diagnosi. Si possono ottenere risultati positivi anche in presenza di altri disturbi autoimmuni e/o alcune malattie infettive. Pertanto, è necessario che il medico o il neurologo interpreti i risultati alla luce del quadro clinico del paziente e dei risultati di altri test di laboratorio. Alcuni sieri potrebbero in alcuni casi reagire al marker di peso molecolare, la cui rilevanza non è nota.

GUIDA ALL'INDIVIDUAZIONE DEI PROBLEMI

- Banda/e forte/i sulla striscia del Controllo Negativo.** Probabile causa: flaconcino del Controllo Negativo contaminato, o contaminazione crociata da un pozzetto contenente un siero positivo.
- Il Controllo Positivo appare come una striscia del Controllo Negativo.** Probabile causa: il flaconcino del Controllo Negativo è stato confuso con il flaconcino del Controllo Positivo.
- Le strisce sono completamente bianche.** Probabile causa: è stata omessa l'aggiunta del Coniugato o del Substrato.
- Background elevato e contrasto debole tra le bande e il fondo.** Probabile causa: sono state omesse una o più fasi di lavaggio o non sono state eseguite correttamente, oppure il periodo/i periodi di incubazione è stato/sono stati superiore/i a quello indicato.

VALORI ATTESI

Incidenza di Anticorpi of anti-MAG nelle Neuropatie¹⁰

Malattia	n	positivi	% positivi
Polineuropatia+ Gammopatia IgM	40	26	65
Neuropatie Demyelinizzante	33	26	78
Neuropatia Assonale	6	0	0

Associazione dei Titoli degli Anticorpi anti-MAG con Progressione verso Neuropatia Clinica¹¹

anti-MAG Titer	nessuna neuropatia n=17	subclinica n=7	confermata clinica n=6
Alto 1:25,000,000 a	1	3	3
1:100,000 Basso 1:6,400 a	6	2	1
1:200 Negativo <1:10	10	2	2

LIMITI DELLA PROCEDURA

Il Test Western Blot ImmuBlot™ per gli anticorpi anti-MAG deve essere utilizzato quale ausilio nella diagnosi. Si possono ottenere risultati positivi anche in presenza di altri disturbi autoimmuni e/o alcune malattie infettive. Pertanto, è necessario che il medico o il neurologo interpreti i risultati alla luce del quadro clinico del paziente e dei risultati di altri test di laboratorio. Alcuni sieri potrebbero in alcuni casi reagire al marker di peso molecolare, la cui rilevanza non è nota.

GUIDA ALL'INDIVIDUAZIONE DEI PROBLEMI

- Banda/e forte/i sulla striscia del Controllo Negativo.** Probabile causa: flaconcino del Controllo Negativo contaminato, o contaminazione crociata da un pozzetto contenente un siero positivo.
- Il Controllo Positivo appare come una striscia del Controllo Negativo.** Probabile causa: il flaconcino del Controllo Negativo è stato confuso con il flaconcino del Controllo Positivo.
- Le strisce sono completamente bianche.** Probabile causa: è stata omessa l'aggiunta del Coniugato o del Substrato.
- Background elevato e contrasto debole tra le bande e il fondo.** Probabile causa: sono state omesse una o più fasi di lavaggio o non sono state eseguite correttamente, oppure il periodo/i periodi di incubazione è stato/sono stati superiore/i a quello indicato.

(dMAG). L'attinenza clinica di dMAG é sconosciuta. Inoltre, la striscia del controllo positivo sviluppa il marker per l'allineamento di 65 kD di colore blu (vedi Figura 1).

Reazione del Controllo Negativo: La striscia del controllo negativo mostra solo il marker per l'allineamento di 65 kD di colore blu-violetto (vedi Figura 2).

Figura 1

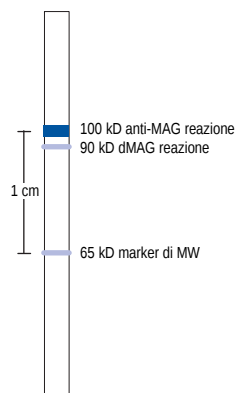
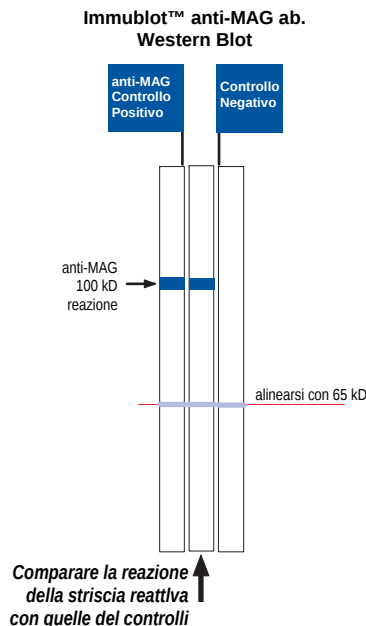


Figura 2



RISULTATI

Linee Guida per la Lettura e l'Interpretazione

Le strisce Immublot™ contengono glicoproteine associate alla mielina di peso molecolare 100 kD. La proteina di pm 65 kD funge da marker di peso molecolare in modo da favorire l'allineamento delle strisce sulla card di controllo (vedi Figura 1).

5. Tenere la striscia campione tra le strisce dei controlli positivo e negativo sulla card di controllo laminata fornita e allinearla utilizzando il marker di peso molecolare 35 kD come punto di riferimento (vedi Figura 2).
6. Comparare la reazione della striscia reattiva con quelle dei controlli su entrambi i lati.
7. Se la banda sulla striscia reattiva si allinea alla banda di 100 kD sulla striscia del controllo positivo, si tratta di una reazione anti-MAG. Tale reazione deve considerarsi positiva. Le reazioni positive possono manifestarsi con varie intensità, da quella debole a quella più forte. Le reazioni deboli devono essere comparate con le intensità base nella corrispondente posizione sulla striscia del controllo negativo. La Figura 2 fornisce un esempio di un risultato positivo allineato correttamente.
8. Se non sono visibili bande reattive e/o bande non corrispondenti alla reazione anti-MAG di 100 kD della card di controllo, i risultati devono considerarsi negativi al test anti-MAG.



ImmuBlot™

Immunoessai Western-Blot des anti-glycoprotéine associée à la myéline (anti-MAG)

[IVD]

[REF] 1173

20 mesures

Un immunoessai Western-Blot pour la détection des anticorps associés principalement aux anti-glycoprotéines associées à la myéline (anti-MAG) et autres auto-anticorps glycolipides dans le sang humain.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Les réponses auto-immunes des systèmes nerveux périphériques, reconnus comme des *neuropathies périphériques* sont des manifestations associées aux auto-anticorps contre divers conjugués glycolipiques neuraux. Ces neuropathies peuvent être aiguës, chroniques, impliquer une dégénérescence axonale ou une démyélination. Les neuropathies auto-immunes peuvent encore être divisées en gammopathies monoclonales et en polyneuropathies inflammatoires polyclonales comme le syndrome de Guillain-Barre, la polyneuropathie démyélinisante inflammatoire chronique (CIDP), la neuropathie motrice multifocale (MMN) et les neuropathies paranéoplasiques. Dans ces maladies, il y a des chevauchements importants des auto-antigènes impliqués qui modèrent le mécanisme pathogénique. Les auto-anticorps spécifiques des nerfs périphériques suivants sont trouvés dans ces neuropathies¹⁻⁶ :

- a) l'anti-glycoprotéine associée à la myéline (MAG),
- b) les glycolipides anti-acidiques tels que le sulfo-glucuronyle-paragloboside (SGPG),
- c) les anti-gangliosides,
- d) les anti-protéines associées à la myéline compacte comme P0, P2 et la protéine périphérique de la myéline 22 (PMP22).

L'épitope (HNK1) reconnue par les auto-anticorps MAG humains est un oligosaccharide sulfaté. Le même épitope est partagé par SGPG, P0 et PMP22⁷. Les neuropathies associées avec anti-MAG impliquant des paraprotéinémies IgM sont généralement un groupe de maladies hétérogène, progressant lentement avec évidence de démyélination et un degré variable de perte axonale généralement associée à une ataxie locomotrice. De tous les cas de neuropathie périphérique avec paraprotéinémie IgM, 50 % possèdent des anticorps anti-MAG⁸. Il est perçu que ces auto-anticorps peuvent interférer avec la procédure de myélination, avec l'entretien de la myéline ou avec les interactions entre les cellules de Schwann et les fibres nerveuses. Ainsi, la détection de ces auto-anticorps est utile pour le clinicien, car elle suggère une démyélination active dans une neuropathie périphérique.

L'immunoessai Western-Blot fournit une méthode sensible pour le dépistage simultané et la confirmation des auto-anticorps contre divers antigènes associés à la myéline des nerfs. Les réactions anti-MAG peuvent facilement être observées à 100 kD. Si l'échantillon ne donne aucune immunoréactivité sur le buvard, le résultat doit être rapporté comme étant négatif.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Pour effectuer un test, les bandes sont incubées avec le sang dilué du patient. Les anticorps spécifiquement liés à la myéline associée aux antigènes sur le buvard. Après un lavage correct et une étape d'incubation avec le conjugué IgM anti-humain de chèvre, les bandes sont lavées et incubées avec le substrat enzymique. Les réactions positives anticorps d'anti-MAG apparaissent comme des bandes bleu-violet à 100 kD.

RÉACTIFS

Stockage et préparation

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

Précautions

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

AVERTISSEMENT : L'azoture de sodium (NaN_3) peut réagir avec le plomb et le cuivre pour former des azotures métalliques hautement explosifs. Lors de la mise au rebut des liquides, rincez avec de grands volumes d'eau afin d'éviter l'accumulation d'azotures. NaN_3 est toxique si ingéré. Rapporter immédiatement les incidents au directeur de laboratoire ou au centre antipoison.

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

Matériaux fournis

Western-Blot anti-MAG d'ImmuBlot™ REF 1173

Le kit contient suffisamment de réactifs pour effectuer 40 mesures.

1 x 20	Bandes de buvard Western-Blot
1 x 120 µl	* Contrôle positif anti-MAG (fiOLE au capuchon violet)
1 x 120 µl	* Contrôle négatif (fiOLE au capuchon jaune).
1	Carte de contrôle
1 x 250 µl	* Conjugué IgM anti-humain de chèvre (fiOLE au capuchon bleu)
1 x 60 ml	* Diluant du sang
1 x 25 ml	Substrat enzymatique (bouteille ambrée)
1 fiOLE	* Tampon de lavage en poudre ; à reconstituer à un litre avec de l'eau désionisée ou distillée.
3	Plateaux d'essais
2	Formulaires de rapport
	<i>* Contient < 0,1 % NaN_3</i>

Matériaux nécessaires, mais non fournis

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

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Soltanto gli esemplari del siero dovrebbero essere usati in questa procedura. Grossolanamente emolizzati, gli esemplari lipemici o da microbi contaminati possono interferire con le prestazioni della prova e non dovrebbero essere usati. Immagazzinare gli esemplari a 2-8° C per più che una settimana. Per immagazzinaggio più di lunga durata, gli esemplari del siero dovrebbero essere congelati. Evitare il congelamento e lo scioglimento ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

Note di Procedura

- Leggere attentamente la Metodica prima di procedere con il test.
- Lasciare che i campioni di siero e i reagenti raggiungano la temperatura ambiente per ~30 minuti prima di eseguire il test. Riporre tutti i campioni e i reagenti non utilizzati nel frigorifero immediatamente dopo l'uso.
- Una corretta tecnica di lavaggio è fondamentale per ottenere prestazioni soddisfacenti del test.
- Maneggiare le strisce reattive solo con pinze pulite. Non toccarle con mani nude.
- Le strisce sono numerate singolarmente, at the bottom of each strip. Assegnare ai campioni dei numeri di identificazione corrispondenti alle relative strisce e annotarli nel Report.
- Compilare il Report con altre eventuali informazioni importanti prima di eseguire il test.

Metodica d'Analisi

- Utilizzare pinze con punte arrotondate, porre il numero necessario di **Strisce** etichettate nei singoli pozzetti della vaschetta.
- Pipettare **1,0 ml** di Diluente di Siero in ciascun pozzetto.
- Pipettare **10 µl** di Controllo Positivo e Negativo e di campione nei pozzetti appropriati per ottenere una **diluizione 1:101**. Incubare per **60 minuti** (±5 min.) a temperatura ambiente su un agitatore oscillante o rotante.
- Aspirare la soluzione del campione in un contenitore di rifiuti. Lavare accuratamente le strisce con del Tampone di Lavaggio spruzzando circa 2ml di soluzione direttamente sulle strisce. Lavare le strisce scuotendole lievemente per **5 minuti** e aspirare la soluzione in un contenitore di rifiuti. **Ripetere 2x.** *Attenzione: Un lavaggio completo delle strisce tra un'incubazione e l'altra è fondamentale per ottenere risultati validi. Un lavaggio non adeguato darà origine a un'intensa colorazione di fondo.*
- Pipettare **1,0 ml** di Diluente di Siero e **10 µl** di Coniugato in ciascun pozzetto. Incubare per **30 minuti** (±5 min) a temperatura ambiente su un agitatore oscillante o rotante.
- Ripetere il **Punto 4**.
- Pipettare **1,0 ml** di Substrato in ciascun pozzetto e incubare a temperatura ambiente per **10 minuti** (±5 min) scuotendoli delicatamente e ponendoli lontano dalla luce.
- Lavare accuratamente le strisce con l'acqua deionizzata spruzzando circa 2ml di acqua direttamente sulle strisce. Lavare le strisce scuotendole lievemente per **5 minuti** e aspirare l'acqua in un contenitore di rifiuti. **Ripetere.**
- Utilizzare pinze con punte arrotondate, togliere le strisce dalla vaschetta e porle delicatamente su della carta assorbente. Maneggiare le strisce solo alla loro estremità e lasciarle asciugare per **15-20 minuti**.

Controllo di Qualité

Nonostante le card di controllo siano molto specifiche, in ciascuna seduta è necessario utilizzare anche i controlli positivi e negativi per assicurare una prestazione corretta del test.

Reazione del Controllo Positivo: Compare a 100 kD (indicate sulla scheda di controllo con la freccia) una banda di colore blu-violetto compatta e diffusa, che rappresenta la reazione anti-MAG. Una seconda banda può comparire direttamente sotto questa fascia a kD 90, rappresentante il MAG degradato

ambiente (~22°). Le strisce dell'antigene possono essere usate soltanto una volta. Non interscambiare i componenti dei lotti differenti. Non usare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sulle etichette.

Precauzioni

Tutte le fonti umane di materiali usati nella preparazione dei controlli per questo prodotto sono state testate e sono risultate negative per la presenza di anticorpi anti-HIV, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV mediante metodi approvati dall'FDA. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

La sodio azide è usata come conservante. La sodio azide è un veleno e può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Lasciar scorrere grandi quantità di acqua, se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, per prevenire la formazione di azidi.

La sostituzione di componenti diversi da quelli forniti nel kit può causare risultati non attendibili. Usare le buone tecniche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare dopo la data di scadenza.

Materiali forniti

ImmuBlot™ anti-MAG Western Blot REF 1173

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 20 determinazioni ciascuno.

- | | |
|-------------------|---|
| 1 x 20 | strisce anti-MAG Western Blot |
| 1 x 120 µl | *controllo positivo, pronto al uso (<i>protezione viola</i>) |
| 1 x 120 µl | *controllo negativo, pronto al uso (<i>protezione gialla</i>) |
| 1 | scheda di controllo |
| 1 x 250 µl | *coniugato IgM capra anti-umana (<i>protezione blu</i>) |
| 1 x 60 ml | *diluente per campioni |
| 1 x 25 ml | *substrato enzimatico |
| 1 fiala | *tampone di lavaggio per 1 litro/fiala |
| 3 | bagni di analisi |
| 2 | documentazione |

* Contains < 0,1% NaN₃

Materiali Richiesti Ma Non forniti

- Pulire il cilindro 1000 ml
- Forcipe Non-segheettato
- Attuatore o agitatore di rotazione della piattaforma
- Carta assorbente o tovaglioli di carta
- Deionizzato o acqua distillata
- Bottiglia di compressione all'amplificatore della lavata diluito stretta
- Pipette capaci di trasporti del 10 – 1000 µl
- A gettare pipettare le punte
- Temporizzatore

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

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

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

PROCÉDURE

Notes de procédure

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

Méthode de test

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

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

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

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

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

Etape 6 Répéter l'étape 4.

Etape 7 Verser **1,0 ml** à la pipette de substrat dans chaque puits et incuber en remuant légèrement pendant **10 minutes** (±5 min) à température ambiante et à lumière réduite.

Etape 8 Laver soigneusement les bandes avec de l'eau désionisée en faisant gicler environ 2 ml de solution directement sur les bandes. Laver les bandes avec une légère agitation pendant **5 minutes** et aspirer l'eau dans un bac à déchets. **Répéter.**

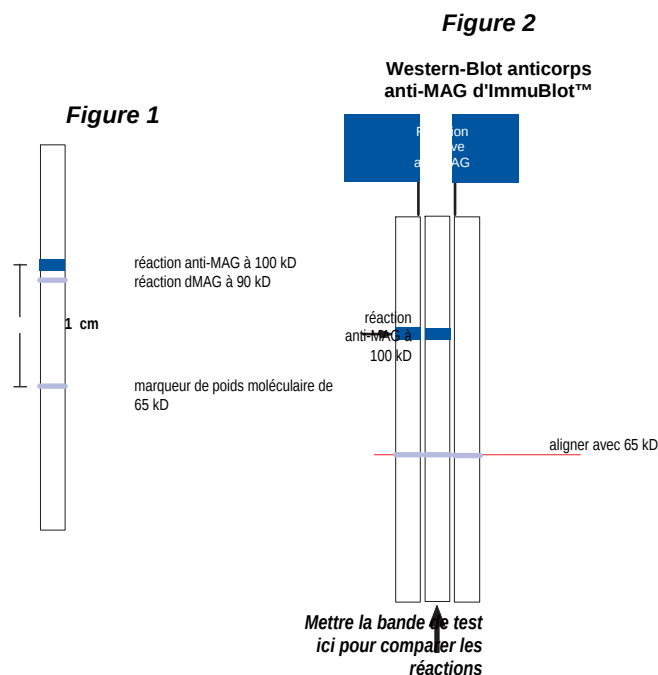
Etape 9 À l'aide de forceps émousés, retirer les bandes du plateau à essai et les mettre délicatement sur du papier absorbant. Ne manipuler les bandes que par leurs extrémités et les laisser sécher entre **15 et 20 minutes**.

Contrôle de la qualité

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

Réaction de contrôle positif : Une bande bleu-violet dense et diffuse apparaît à 100 kD (indiquée sur la carte de contrôle avec une flèche), représentant la réaction anti-MAG. Une deuxième bande peut apparaître directement en dessous de cette bande à 90 kD, représentant un MAG dégradé (dMAG). L'intérêt clinique de dMAG est inconnu. De plus, le buvard de contrôle positif présentera un marqueur d'alignement bleu à 65 kD (se reporter à la Figure 1).

Réaction de contrôle négatif : La réaction de contrôle négatif ne présentera qu'un marqueur d'alignement bleu-violet à 65 kD (se reporter à la Figure 2).



RÉSULTATS

Conseils de lecture et d'interprétation

Les bandes d'ImmuBlot™ contiennent des glycoprotéines associées à la myéline d'un poids moléculaire de 100 kD. La protéine à 65 kD sert de marqueur de poids moléculaire pour aider à aligner les bandes sur la carte de contrôle (se reporter à la Figure 1).



ImmuBlot™

Anticorpi Anti-Glicoproteina Associati alla Mielina (anti-MAG) Test Western Blot

IVD

REF

Code: 1173

20 Determinazioni

USO PREVISTO

Test Western Blot per la determinazione degli anticorpi diretti contro glicoproteine associate alla mielina (anti-MAG) ed altri autoanticorpi glicolipidici nel siero umano.

RIEPILOGO

Le risposte autoimmuni del sistema nervoso periferico, conosciute come *neuropatie periferiche*, sono manifestazioni associate ad autoanticorpi diretti contro vari glicocongiugati neurali. Queste neuropatie possono essere acute o croniche, e possono comportare una degenerazione assonale o una demielinizzazione. Le neuropatie autoimmuni si possono ulteriormente dividere in gammopatie monoclonali e polineuropatie infiammatorie policlonali, quali la sindrome di Guillain-Barré, la *Polineuropatia Demielizzata Infiammatoria Cronica* (CIDP), la *Neuropatia Motoria Multifocale* (MMN), e le *neuropatie paraneoplastiche*. In queste malattie si verifica una significativa sovrapposizione degli autoantigeni coinvolti, che modificano il meccanismo patogeno. Di seguito sono elencati gli anticorpi diretti contro specifici componenti del nervo periferico trovati in tutte queste neuropatie¹⁻⁶:

- a) anti-glicoproteina associata alla mielina (MAG),
- b) anti-glicolipidi come il solfo-glucuronil paragloboside (SGPG),
- c) anti-gangliosidi
- d) anti-proteine associate alla mielina compatta come la P0, la P2, e la proteina mielina periferica 22 (PMP22).

L'epitopo (HNK1) riconosciuto dagli autoanticorpi anti-MAG umani è l'oligosaccaride solfato. Questo stesso epitopo è condiviso da SGPG, P0 e PMP22⁷. Le neuropatie associate agli anti-MAG con paraproteinemia IgM fanno parte di un gruppo molto eterogeneo, con decorso lento, tracce di demielinizzazione e un grado variabile di perdita assonale, generalmente collegata a un'atassia dell'equilibrio. Di tutti i casi di neuropatie periferiche con paraproteinemia IgM, il 50% presenta anticorpi anti-MAG⁸. Sembra che questi autoanticorpi possano interferire con il processo di mielinizzazione, con la conservazione della mielina o con le interazioni assone-cellula di Schwann. Pertanto, l'identificazione di questi autoanticorpi è utile per il medico, in quanto indice di una demielinizzazione attiva in corso in una neuropatia periferica.

Il Test Western Blot è un metodo sensibile che permette di procedere contemporaneamente allo screening e alla conferma di autoanticorpi diretti contro vari antigeni del nervo associati alla mielina. Le reazioni anti-MAG si possono osservare a 100 kD. Se il campione non reagisce alla striscia, il risultato deve considerarsi negativo.

PRINCIPIO DEL METODO

Per eseguire il test, le strisce vengono incubate con siero diluito del paziente. Gli anticorpi si legano specificamente agli antigeni associati alla mielina presenti sulla striscia. Dopo lavaggio accurato e incubazione con coniugato anti-IgM umane di capra, le strisce vengono lavate e incubate con substrato enzimatico. La comparsa di bande di colore blu-violetto a 100 kD sta ad indicare che la reazione è positiva agli anticorpi anti-MAG.

REAGENTI

Condizioni di conservazione

Immagazzinare tutti i reagenti a 2-8° C. **Non congelare.** Non usare, se i reagenti liquidi sono torbidi o un precipitato è presente. Prima dell'iniziare l'analisi, i reagenti devono essere equilibrati alla temperatura

VALORES PREVISTOS

Incidência de anticorpos anti-neurais (anti-MAG) em Neuropatias¹⁰

Distúrbio	n	positivo	% positivo
Polineuropatia IgM gamopatia	40	26	65
Neuropatias desmielinizantes	33	26	78
Neuropatia axonal	6	0	0

Associação de Títulos de Anticorpos anti-MAG com a Progressão para Neuropatia Clínica¹¹

Título anti-MAG	não neuropatia n=17	subclínica n=7	clínica confirmada n=6
Elevado 1:25,000,000 a	1	3	3
1:100,000 Baixo 1:6,400 a	6	2	1
1:200 Negativo <1:10	10	2	2

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O ensaio Western Blot de Anticorpos anti-MAG da Immublot™ deve ser utilizado como meio auxiliar de diagnóstico. Os resultados positivos podem ser encontrados noutras condições autoimunes e / ou em determinadas doenças infecciosas. Por isso, os resultados devem ser avaliados e interpretados pelo clínico ou neurologista face aos antecedentes clínicos do paciente e a outros resultados laboratoriais. Alguns soros podem reagir ocasionalmente ao marcador MW, cuja importância não é conhecida.

GUIA PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

- Banda(s) forte(s) na tira do Controlo Negativo.** Causa provável: frasco do Controlo Negativo contaminado ou contaminação cruzada por um poço que contém um soro positivo.
- O Controlo Positivo aparece como tira de Controlo Negativo.** Causa provável: o frasco do Controlo Negativo foi confundido como o frasco do Controlo Positivo.
- As tiras estão totalmente brancas.** Causa provável: a adição do Conjugado ou do Substrato foi omitida.
- Fundo elevado e contraste deficiente entre as bandas e o fundo.** Causa provável: os passos de lavagem podem ter sido omitidos ou executados incorretamente, ou as incubações ultrapassaram o limite.

- Tenir le buvard de l'échantillon testé entre les buvards de contrôle négatif et positif sur la carte de contrôle plastifiée fournie et aligner la bande de test en utilisant le marqueur de poids moléculaire à 65 kD comme point de référence (*se reporter à la Figure 2*).
- Comparer la réaction du buvard de test avec celle des contrôles de chaque côté.
- Si la bande sur le buvard de test s'aligne avec la bande des 100 kD du buvard du contrôle positif, il s'agit d'une réaction anti-MAG. Une telle réaction doit être considérée comme positive. Les réactions positives peuvent aussi se produire avec des intensités variées, allant d'une faible intensité à une forte intensité. Les réactions faibles doivent être comparées avec la ligne de base des intensités de réaction à la position correspondante sur le buvard de contrôle négatif. La Figure 2 fournit un exemple de résultat positif correctement aligné.
- S'il n'existe aucune bande de réaction visible et/ou aucune bande correspondant à une réaction anti-MAG à 100 kD sur la carte de contrôle, ces résultats doivent être considérés comme une réaction anti-MAG négative.

VALEURS ATTENDUES

Incidence d'un anticorps anti-nerf (anti-MAG) dans les neuropathies¹⁰

Trouble	n	positif	% positif
Polyneuropathie Gammopathie IgM	40	26	65
Neuropathies démýélisantes	33	26	78
Neuropathie axonale	6	0	0

Association des titres anticorps anti-MAG avec la progression de la neuropathie clinique¹¹

anti-MAG Titre	pas de neuropathie n=17	sous-clinique n=7	clinique confirmée n=6
Élevée de 1:25 000 000 à 1:100 000	1	3	3
Faible de 1:6 400 à 1:200	6	2	1
Négatif <1:10	10	2	2

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Le Western-Blot anticorps anti-MAG d'ImmuBlot™ doit être utilisé comme une aide au diagnostic. Les résultats positifs peuvent être trouvés dans d'autres conditions auto-immunes et/ou certaines maladies infectieuses. Ainsi les résultats doivent être évalués et interprétés par le clinicien ou le neurologue en fonction de l'historique clinique du patient et des autres résultats de laboratoire. Certains sangs peuvent réagir occasionnellement au marqueur MW. L'importance de cette réaction est inconnue.

GUIDE DE DÉPANNAGE

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

Figura 1

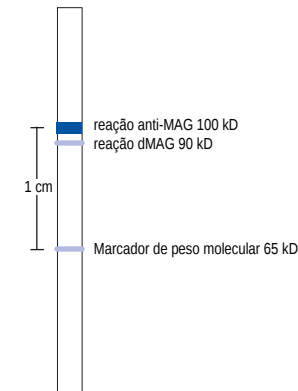
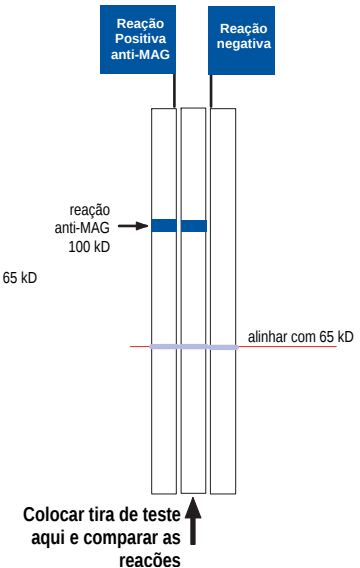


Figura 2

ImmuBlot™ anti-MAG ab.
Western Blot

RESULTADOS

Diretrizes de Leitura e Interpretação

As tiras ImmuBlot™ contêm glicoproteínas associadas à mielina com um peso molecular de 100 kD. A proteína de 65 kD serve como marcador do peso molecular para ajudar a alinhar as tiras no cartão de controle (consultar a Figura 1).

- 1.º **Passo** Segurar a tira da amostra de teste entre as tiras dos controles positivo e negativo no Cartão de Controle laminado fornecido e alinhar a tira de teste utilizando o marcador de peso molecular de 65 kD como ponto de referência (consultar a Figura 2).
- 2.º **Passo** Comparar a reação da tira de teste com a dos controles em ambos os lados.
- 3.º **Passo** Se a banda da tira de teste se alinhar com a banda de 100 kD na tira do controle positivo, essa é uma reação anti-MAG. Essa reação deve ser considerada positiva. As reações positivas podem igualmente ocorrer com diferentes intensidades, de fracas a fortes. As reações fracas devem ser comparadas com intensidades de reação da linha de base na posição correspondente na tira do controle negativo. A Figura 2 fornece um exemplo de um resultado positivo alinhado de forma apropriada.
- 4.º **Passo** Se não houver qualquer reação, as bandas visíveis e/ou as bandas que não correspondem à reação anti-MAG 100 kD do cartão de controle, estes resultados devem ser considerados anti-MAG negativos.

Controlo de Qualidade

Embora os cartões de controlo sejam específicos para cada lote, os controlos negativo e positivo devem ser incluídos em cada teste a fim de garantir o desempenho adequado do ensaio.

Reação do Controlo Positivo: Irá surgir uma banda azul-violeta densa e difusa a 100 kD (indicada no cartão de controlo com uma seta), representando a reação anti-MAG. Pode aparecer uma segunda banda diretamente abaixo desta banda a 90 kD, representando MAG degradado (dMAG). A relevância clínica do dMAG é desconhecida. Em aditamento, a tira do controlo positivo exibirá um marcador de alinhamento azul a 65 kD (*consultar a Figura 1*).

Reação do Controlo Negativo: A reação do controlo negativo apenas exibirá o marcador de alinhamento azul-violeta a 65 kD (*consultar a Figura 2*).



ImmuBlot™

Ensaio Imunoenzimático Western Blot Glicoproteínas Associadas à Mielina (anti-MAG)

IVD

REF

1173 20 determinações

Um ensaio imunoenzimático Western Blot para a deteção de anticorpos para glicoproteínas essencialmente associadas à anti-mielina (anti-MAG) e outros autoanticorpos glicolipídicos em soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

As respostas autoimunes do sistema nervoso periférico, reconhecidas como *neuropatias periféricas*, são manifestações associadas a autoanticorpos contra diversos glicoconjugados neurais. Estas neuropatias podem ser agudas, crónicas, envolver degeneração axonal ou desmielinização. As neuropatias autoimunes podem dividir-se ainda em gamopatias monoclonais e em polineuropatias inflamatórias policlonais, tais como a síndrome de Guillain-Barre, polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica (PDIC), neuropatia motora multifocal (NMM) e neuropatias paraneoplásicas. Nestas doenças, existe uma sobreposição significativa dos autoantígenos envolvidos que fazem a mediação do mecanismo patogénico. Nestas neuropatias são encontrados os seguintes autoanticorpos específicos de nervos periféricos⁶:

- a) glicoproteína associada à anti-mielina (MAG);
- b) glicolípidos antiácidos como o paraglobósido glucoronil sulfatado (SGPG);
- c) antigangliósidos;
- d) proteínas associadas à mielina anti-compacta como P0, P2 e proteína da mielina periférica 22 (PMP22).

O epítipo (HNK1) reconhecido pelos autoanticorpos MAG humanos é um oligossacarídeo sulfatado. Este mesmo epítipo é partilhado pela SGPG, P0 e PMP22⁷. As neuropatias associadas a anti-MAG com paraproteinemia IgM são normalmente um grupo de doenças heterogéneo, progressivo e lento com evidências de desmielinização e um grau variável de perda axonal normalmente associada a marcha atáxica. De todos os casos de neuropatia periférica com paraproteinemia IgM, 50% possuem anticorpos anti-MAG. É percecionado que estes autoanticorpos podem interferir com o processo de mielinização, com a manutenção da mielina ou com as interações axónio - células de Schwann. Assim, a deteção destes autoanticorpos é útil para os clínicos, pois a mesma sugere desmielinização ativa numa neuropatia periférica.

O ensaio imunoenzimático Western Blot fornece um método sensível para o rastreio e confirmação em simultâneo de autoanticorpos contra diversos antígenos associados à mielina do nervo. As reações anti-MAG podem ser observadas facilmente a 100 kD. Se a amostra não produzir imunorreatividade na tira da amostra, o resultado deve ser relatado como negativo.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Para realizar o teste, as tiras são incubadas com soro diluído do paciente. Os anticorpos ligam-se especificamente aos antígenos associados à mielina na tira. Após uma lavagem adequada e um passo de incubação com conjugado IgM anti-humano de cabra, as tiras são lavadas e incubadas com substrato enzimático. Surgem reações positivas de anticorpos anti-MAG como bandas azul-violeta a 100 kD.

REAGENTES

Armazenamento e preparação

Armazenar todos os reagentes a 2-8°C. **Não congelar.** Não utilizar se os reagentes líquidos estiverem turvos ou se houver a presença de um precipitado. Antes de iniciar o ensaio, os reagentes devem ser equilibrados à temperatura ambiente (~22°). As tiras de antígenios apenas podem ser utilizadas uma vez. Não trocar componentes de diferentes lotes. Não utilizar os reagentes para além da data de validade impressa nos rótulos.

Precauções

Todos os componentes humanos utilizados foram testados para HBSAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e considerados negativos pelos testes exigidos pela FDA No entanto, todas as substâncias derivadas do sangue humano e as amostras de pacientes devem ser consideradas potencialmente infecciosas, devendo ser seguidas as boas práticas laboratoriais em matéria de armazenamento, distribuição e eliminação destes materiais⁹.

ADVERTÊNCIA – A azida de sódio (NaN₃) pode reagir com canalizações de chumbo e cobre, formando azidas de metal altamente explosivas. Após a eliminação dos líquidos, lavar com água abundante para prevenir a formação de azidas. A NaN₃ é tóxica em caso de ingestão. Os incidentes devem ser relatados de imediato ao diretor do laboratório ou ao centro de controlo de venenos.

Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais para minimizar a contaminação microbiana e cruzada dos reagentes.

Materiais fornecidos

Western Blot anti-MAG ImmuBlot™ REF 1173

O kit contém reagentes suficientes para executar 20 determinações.

1 x 20	Tiras Western Blot
1 x 120 µl	*Controlo Positivo anti-MAG (<i>tampa roxa</i>)
1 x 120 µl	*Controlo Negativo (<i>tampa amarela</i>).
1	Cartão de Controlo
1 x 250 µl	*Conjugado IgM anti-humano de cabra (<i>tampa azul</i>)
1 x 60 ml	*Diluyente de soro
1 x 25 ml	Substrato Enzimático (<i>frasco âmbar</i>)
1 ampola	*Tampão de Lavagem de Pó; reconstituir para um litro com água desionizada ou destilada.
3	Bandejas de ensaio
2	Formulários de relatório

* Contém < 0,1% NaN₃

Material Exigido Mas Não Fornecido

- Cilindro graduado de 1000 ml limpo
- Fôrceps não-serrilhado (Fôrceps filtro)
- Agitador de balanço ou agitador rotativo
- Papel absorvente ou toalhetes de papel
- Água desionizada ou destilada
- Garrafa de plástico para conter o tampão de lavagem diluído

- Pipetas com capacidade de libertação de 10 a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Temporizador

RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas ou microbiologicamente contaminadas podem interferir nos resultados do teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2°C a 8°C durante o máximo de uma semana. Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro devem ser congeladas a uma temperatura inferior a -20°C. Evitar o repetido congelamento e descongelamento repetido das amostras..

PROCEDIMENTO

Notas relativas ao Procedimento

- Ler cuidadosamente o folheto do produto antes de iniciar o ensaio. Permitir que as amostras de soro e os reagentes do ensaio se equilibrem a uma temperatura ambiente durante ~30 minutos antes de iniciar o procedimento de teste. Voltar a colocar todas as amostras e reagentes não utilizados no frigorífico imediatamente após a sua utilização.
- Uma boa técnica de lavagem é fundamental para o desempenho satisfatório do ensaio.
- As tiras de teste devem ser exclusivamente manuseadas com um fôrceps limpo. Não tocar com as mãos.
- As tiras estão individualmente numeradas na parte inferior de cada tira. Atribuir números identificativos de amostras às tiras correspondentes no Formulário de Relatório. Preencher todas as outras informações relevantes do Formulário de Relatório antes de iniciar o ensaio.

Método de Teste

- 1.º Passo Com um fôrceps plano, colocar o número necessário de **Tiras** com o rótulo para cima em poços individuais da bandeja de ensaio.
- 2.º Passo Pipetar **1,0 ml** de Diluyente de Soro em cada poço.
- 3.º Passo Pipetar **10 µl** dos Controlos Positivo e Negativo e as amostras de pacientes nos poços apropriados para obter uma **diluição de 1:101**. Incubar durante **60 minutos** (±5 min.) a temperatura ambiente num agitador de balanço ou agitador rotativo.
- 4.º Passo Aspirar a solução da amostra para o recipiente de resíduos. Lavar bem as tiras com Tampão de Lavagem, esguichando aproximadamente 2 ml de solução diretamente sobre as tiras. Lavar as tiras com agitação suave durante **5 minutos** e aspirar a solução para o recipiente de resíduos. **Repetir 2x. Atenção: A lavagem completa das tiras entre incubações é fundamental para obter resultados válidos. A lavagem inadequada resultará em elevada coloração de fundo.**
- 5.º Passo Pipetar **1,0 ml** de Diluyente de Soro, seguido de **10 µl** de Conjugado em cada poço. Incubar durante **30 minutos** (±5 min.) a temperatura ambiente num agitador de balanço ou agitador rotativo.
- 6.º Passo Repetir o 4.º Passo.
- 7.º Passo Pipetar **1,0 ml** de Substrato em cada poço e incubar com agitação suave durante **10 minutos** (±5 min) a temperatura ambiente e pouca luminosidade.
- 8.º Passo Lavar bem as tiras com água desionizada, esguichando aproximadamente 2ml de solução diretamente sobre as tiras. Lavar as tiras com agitação suave durante **5 minutos** e aspirar a água para o recipiente de resíduos. **Repetir.**
- 9.º Passo Com um fôrceps plano, remover as tiras da bandeja de ensaio e colocá-las suavemente sobre papel absorvente. Manusear as tiras apenas nas extremidades e deixá-las secar durante **15-20 minutos**.