

Mode d'emploi Anti-Gangliosid Dot (#5003)

20 x 12 déterminations







(30/05/2008)



IVD

Utilisation pour le diagnostic in vitro

Immunodot pour la détection des anticorps IgG et/ou IgM contre les gangliosides dans le sérum, le plasma ou le liquide céphalo-rachidien.

REF	N° de catalogue	LOT	N° de lot
	Se référer aux documents		Fabriqué par
	A stocker à		Date de péremption
	Consulter le mode d'emploi		Risque biologique

Introduction

Les neuropathies inflammatoires du système périphérique ont une présentation clinique très polymorphe allant d'une simple fatigue ou de troubles neuromoteurs légers à la paralysie ou l'arrêt cardiaque.

Parmi ces affections, les neuropathies auto-immunes sont caractérisées par la présence d'auto-anticorps dirigés contre les structures nerveuses : gangliosides, myéline, axone... Les gangliosides sont des glycosphingolipides composés de plusieurs chaînes d'oligosaccharides sialylés liés à une partie lipidique, le céramide. Ils sont abondamment présents dans les membranes cellulaires, en particulier dans le système nerveux central et périphérique. Des déterminants antigéniques structurellement proches des gangliosides sont présents à la surface des microorganismes. Les neuropathies inflammatoires peuvent apparaître suite à une infection à *Campylobacter jejuni*, Cytomegalovirus, EBV, *Mycoplasma pneumoniae* ou à *Haemophilus influenzae*. Les anticorps produits contre les structures gangliosidiques des microorganismes sont aussi susceptibles de réagir contre les gangliosides de la gaine de myéline ou de la neurofibre et d'induire une réaction inflammatoire avec une démyélinisation ultérieure.

Les anticorps anti-gangliosides décrits ci-dessous sont spécifiques des neuropathies du système nerveux périphérique :

Syndrome de Guillain-Barré	GM1, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b	IgG (IgM)
Syndrome de Miller-Fisher	GQ1b, GT1a	IgG
Neuropathie motrice multifocale	GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b	IgM
Polyneuropathies inflammatoires chroniques démyélinisantes	GM2, GM3, GD1a, GD1b	IgM
CANOMAD (Chronic Ataxic Neuropathy, Ophthalmoplegia, M-protein, Agglutination, Disialosyl antibodies)	GM3, GD1b, GD2, GD3, GT1b, GQ1b	IgM
Neuropathie sensitive ataxiante aigüe	GD1b, GD3	IgG
Neuropathie musculaire axonale aigüe	GM1, GD1a	IgG
Neuropathie démyélinisante avec paraprotéïnémie IgM	Sulfatides	IgM (IgG)

En raison des similarités structurales entre les gangliosides GM1 et certains épitopes présents à la surface de divers microorganismes, la présence d'IgM anti-GM1 peut être observée, de manière éphémère, dans le sérum d'individus sains. Une observation ponctuelle d'IgM anti-GM1 n'est donc pas pathognomonique d'une neuropathie.

Willison HJ, Yuki N: Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain*, 2002, 125, 2591-2625

Khalili-Shirazi A, Gregson N, Gray I, Rees J, Winer J, Hughes R: Antiganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome after a recent cytomegalovirus infection, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1999, 66, 376-9

Schwerer B, Neisser A, Bernheimer H: Distinct immunoglobulin class and immunoglobulin G subclass patterns against ganglioside GQ1b in Miller Fisher syndrome following different types of infection. *Infect Immun*, 1999, 67, 2414-201

Alaniz ME, Lardone RD, Yudowski SL, Farace MI, Nore GA: Normally occurring human anti-GM1 immunoglobulin M antibodies and the immune response to bacteria. *Infect Immun*, 2004, 72, 2148-51

Goetz J. et Humbel RL., Neuropathies périphériques auto-immunes. *Revue francophone des laboratoires*, 2008, 404 bis, 1720.

Principe

Anti-gangliosid Dot est un immunodot sensible pour la mise en évidence d'anticorps de classe IgG ou IgM contre les gangliosides dans le sérum, le plasma ou le liquide céphalo-rachidien humain. La trousse contient 20 bandelettes numérotées. Chaque bandelette comportant plusieurs antigènes qui ont été déposés en ligne sur une membrane. La ligne supérieure est un contrôle de réactivité et les 12 lignes suivantes contiennent des gangliosides hautement purifiés dans l'ordre suivant : sulfatides, GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b.

Lors de la première incubation, les auto-anticorps présents dans les échantillons se lient aux antigènes cibles immobilisés sur la membrane. Au terme de 120 minutes d'incubation à 4°C sous agitation, les composants de l'échantillon qui ne se sont pas liés à la membrane sont éliminés par

lavage. Dans une seconde étape, les anticorps du patient réagissent avec un conjugué anti-IgG ou IgM marqué à la peroxydase de Raifort. La trousse permet également de détecter simultanément les anticorps de classe IgG et IgM en utilisant les deux conjugués sur le même plateau. Au terme d'une incubation de 60 minutes à 4°C, l'excès de conjugué est éliminé par lavage.

La peroxydase convertit le substrat incolore en une ligne de précipitation violet foncé. Après 10 minutes sous agitation, la réaction est arrêtée par une dernière étape de lavage.

La lecture des bandelettes s'effectue après séchage.

Préparation des échantillons

Collecte et récolte des échantillons

Prélever le sang par ponction veineuse. Récolter le sérum par centrifugation après coagulation. Le liquide céphalo-rachidien peut également être utilisé dans ce test.

Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2 et +8°C pendant 3 jours maximum, sinon congelés à -20°C.

Eviter les cycles congélation/décongélation.

Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être dosés à 4°C. Les mélanger par inversion avant le dosage.

Réactifs fournis

A		20 bandelettes
Ag	Bandelettes	
	20 bandelettes avec 13 lignes réactives	
	- 12 lignes revêtues de gangliosides hautement purifiés GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, and GQ1b (humain), sulfatides (bovins)	
	- Contrôle réactionnel	
B	Tampon, 10X	2 x 15 ml
BUF	150 ml après reconstitution	Concentré
	10x	Bouchon blanc
C	Conjugué IgG	1.2 ml
CONJ	Anticorps de lapin anti-IgG humaine couplé à la peroxydase de Raifort	Prêt à l'emploi
G		Bouchon rouge
D	Conjugué IgM	1.2 ml
CONJ	Anticorps de lapin anti-IgM humaine couplé à la peroxydase de Raifort	Prêt à l'emploi
M		Bouchon vert
E	Substrat	11 ml
SOLN	3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine	Prêt à l'emploi
TMB		Bouchon bleu
F	Plateau d'incubation à 12 canaux	2 x

Disponible sur commande (#50031) :

P	Contrôle positif	0,1 ml
	Sérum ou plasma humain contenant des anticorps anti-gangliosides (voir fiche jointe)	Prêt à l'emploi
CONTR		+

Matériel supplémentaire

- micropipette 100-1000µl
- micropipette 10-100µl
- pointes
- **réfrigérateur ou chambre froide** pour les 2 premières incubations et les étapes de lavage
- **agitateur à balancier ou rotatif**
- cylindres gradués
- eau distillée et eau déminéralisée
- pincettes en plastique
- papier absorbant

Stockage

Cette trousse permet l'analyse de 20 échantillons. La date d'expiration de chaque composant de la trousse figure sur son étiquette et la date d'expiration de la trousse sur l'étiquette du coffret. Dès réception, conserver tous les composants de la trousse à 2- 8°C, de préférence dans leur emballage d'origine. Après ouverture de la trousse, tous les composants sont stables au minimum 2 mois.

Préparation du dosage

Les deux premières incubations se déroulent à 4°C avec des réactifs réfrigérés (tampon et conjugué).

La deuxième étape de lavage se déroule à température ambiante. Veiller à ramener le tampon à température ambiante. Le substrat doit également être ajouté à température ambiante.

Les bandelettes sont fournies fixées sur un support papier placées à l'intérieur d'un sachet en plastique. Sortir le support papier et découper à l'aide de ciseaux ou d'un scalpel le nombre de bandelettes souhaité. Les bandelettes inutilisées doivent être conservées au sec dans le sachet d'origine.

Diluer 1/10 le tampon (réactif B) avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

Pour chaque bandelette à tester, il faut 10 ml de tampon dilué.
Exemple : 15 ml de tampon concentré + 135 ml d'eau distillée.

Après dilution, le tampon est stable à 2- 8°C pendant 1 mois. Tous les autres composants sont prêts à l'emploi et stables jusqu'à la date d'expiration.

Eviter d'exposer le substrat à la lumière.

Nettoyage du plateau d'incubation

Après une première utilisation, faire tremper le plateau pendant 30 minutes dans de l'eau additionnée d'un détergent. Rincer abondamment.














Remplir tous les canaux avec un alcool quelconque (méthanol, propanol ou éthanol). Mettre à incuber sur l'agitateur pendant 30 minutes et rincer à l'eau.

Nettoyer le plateau d'incubation avec du coton. Rincer à l'eau et laisser sécher.

Mode opératoire

- **Respecter strictement les instructions et éviter tout décalage dans les temps d'incubation**
 - **Tout le dosage doit se dérouler sur un agitateur à balancier**
 - **Jusqu'à l'adjonction du substrat, toutes les incubations se déroulent à 4°C. Conserver les réactifs nécessaires à 4°C**
 - **Après l'incubation du conjugué, le dosage se déroule à température ambiante. Veillez à amener à température ambiante les réactifs nécessaires (tampon B et substrat E)**
- 1- Sortir les réactifs de la trousse et prélever le nombre requis de bandelettes. Mélanger les réactifs par inversion.
 - 2- Pipeter **1 ml** de tampon dilué (préparé à partir du tampon B) dans chaque canal du plateau. Puis, à l'aide de la pincette, placer chaque bandelette dans le canal, **côté réactionnel tourné vers le fond. Il est important de mettre le tampon avant la bandelette, et ensuite de vérifier que celle-ci est bien immergée. Éviter la formation de bulles d'air à la surface de la bandelette côté réactionnel.**
 - 3- Pipeter les échantillons dans chaque canal :
Sérum / Plasma : 10µl (dilution résultante 1/100)
LCR : 50µl (dilution résultante 1/20)
 - 4- Incuber **120 minutes à 4°C** tout en agitant
 - 5- Décanter (Attention : Laisser écouler le liquide d'incubation en inclinant le plateau d'incubation. Eliminer le liquide restant avec du papier absorbant). Distribuer **1 ml de tampon dilué à 4°C**. Incuber **5 minutes sous agitation à 4°C**. Décanter et répéter l'opération 2 fois 5 minutes sous agitation à 4°C pour un total de **3 lavages**.
 - 6- Pipeter 1 ml de tampon dilué à 4°C dans chaque canal et ajouter :
Pour la recherche des IgG : 50µl de conjugué C (à 4°C)
Pour la recherche des IgM : 50µl de conjugué D (à 4°C)
Pour la recherche des IgG et IgM : 50µl de chacun des conjugués C et D (à 4°C)
 - 7- Incuber **60 minutes à 4°C sous agitation**
 - 8- Répéter l'étape 5
 - 9- Pipeter **0,5 ml** de substrat E à **température ambiante** dans chaque canal
 - 10- Incuber 10 à température ambiante (18-25°C) sous agitation
 - 11- Décanter et laver 2 fois avec 1 ml de tampon dilué (à partir de B) à **TEMPERATURE AMBIANTE** pour stopper la réaction du substrat. (Attention : Laisser écouler le liquide d'incubation en inclinant le plateau d'incubation. Eliminer le liquide restant avec du papier absorbant).
 - 12- Saisir les bandelettes par leur extrémité numérotée à l'aide d'une pincette et les déposer sur du papier absorbant face réactionnelle contre le papier. Les presser brièvement. Au bout de 30 minutes, procéder à la lecture.

Lecture des résultats

Anti-Gangliosid Dot	Résultat
	
Positive control	positif
	
Sulfatide	
	
GM1	
	
GM2	
	positif
GM3	
	
GM4	
	
GD1a	
	
GD1b	
	
GD2	
	
GD3	
	
GT1a	
	
GT1b	
	
GQ1b	

Après séchage complet, coller les bandelettes sur la feuille de résultats fournie avec le coffret.

La bande du contrôle réactionnel doit être visible sur toutes les bandelettes. La présence de cette bande colorée garantit la bonne exécution du test et la qualité des réactifs.

Si la bande de contrôle n'apparaît pas, les résultats ne peuvent pas être interprétés.

Résultat positif

Un échantillon est considéré comme positif si l'une des lignes correspondant aux gangliosides est visible.



Résultat négatif

Un échantillon est considéré comme négatif si les lignes correspondant aux gangliosides ne sont pas colorées.

Limites d'utilisation

Les individus sains devraient fournir des résultats négatifs dans ce test. Toutefois, on peut rencontrer des IgM anti-GM1 chez des personnes saines en raison de la réaction croisée avec des antigènes microbiens. D'autre part, des patients asymptomatiques peuvent fournir une réaction positive avec ce test. Les résultats de ce test doivent être interprétés par un médecin en tenant compte de l'ensemble du tableau clinique et biologique.

Précautions d'emploi

- Ce coffret est destiné uniquement à un usage *in vitro*. Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
- Les dates d'expiration sur les différentes étiquettes sont à suivre.
- Ne pas utiliser ou mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser des réactifs d'autres fabricants.
- Eviter les temps morts durant la distribution des réactifs.
- Tous les réactifs doivent être stockés à 2 – 8 °C dans l'emballage d'origine avant toute utilisation.
-  • Certains des réactifs contiennent de faible quantité du kathon (1% p/v) en tant qu'agent conservateur. Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses.
-  • Comme la trousse contient certaines substances présentant un risque biologique, observer les précautions suivantes :
 - Ne pas fumer, manger ou boire lors de la manipulation des réactifs.
 - Toujours utiliser des gants de protection.
 - Ne jamais pipeter avec la bouche.
 - Nettoyer rapidement les réactifs renversés et bien laver la surface avec un décontaminant.