ARBEITSANLEITUNG

REF **5003**

25. Oktober 2010

Anti-Gangliosid Dot

- 20 x 12 Bestimmungen -

IVD *In-vitro*-Diagnostikum

CE

Immunodots zur Bestimmung von
IgG und/oder IgM Antikörpern gegen Ganglioside
in humanem Serum, Plasma oder Liquor

REF	Bestell- Nr.	LOT	Chargen- Nr.
	Siehe Beipackzettel		Hersteller
	Lagertemperatur		Verfallsdatum
	Siehe Arbeitsanleitung		Biologische Gefahr

GA GENERIC ASSAYS GmbH

Ludwig-Erhard-Ring 3

15827 Dahlewitz, Germany

Telefon: +49 (0) 33708-9286-0
Fax: +49 (0) 33708-9286-50

www.genericassays.com

ANWENDUNG

Anti-Gangliosid Dot ist ein Reagenziensatz zur qualitativen Bestimmung von IgG oder IgM Antikörpern gegen Ganglioside in humanem Serum, Plasma oder Liquor für die Differentialdiagnose von autoimmunen Neuropathien. Die Durchführung eines IgG/IgM Antikörperscreens ist ebenfalls möglich.

Entzündliche Neuropathien des peripheren Nervensystems sind durch zahlreiche klinische Symptome gekennzeichnet, die von leichter Ermüdbarkeit und uncharakteristischem Missempfinden über neuromuskuläre Störungen bis zu Funktionsausfällen wie Atemlähmung und Herzstillstand reichen können.

Bei Erkrankungen des peripheren Nervensystems sind in der letzten Zeit zunehmend Autoantikörper gegen Ganglioside identifiziert worden. Ganglioside sind saure Glycolipide, die aus einem Lipid (Ceramid), einer Oligosaccharidkette und einer Sialinsäure bestehen. Ganglioside sind Bestandteile von Zellmembranen, darüber hinaus werden sie besonders im zentralen und peripheren Nervensystem gefunden. Gangliosidähnliche Strukturen kommen auch an der Oberfläche von Mikroorganismen vor. So treten entzündliche Neuropathien häufig infolge einer Infektion mit Campylobacter jejuni, Cytomegalievirus, Epstein-Barr Virus, Mycoplasma pneumoniae oder Hämophilus influenzae auf. Antikörper gegen Gangliosidstrukturen der Erreger können mit Gangliosiden von Markscheiden oder Nervenfasern kreuzreagieren und bewirken Entzündungen mit nachfolgender Demyelinisierung.

Folgende Anti-Gangliosid Antikörper wurden als charakteristisch für periphere Neuropathien beschrieben:

Guillain-Barré Syndrom	GM1, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b	IgG (IgM)
Miller-Fisher Syndrom	GQ1b, GT1a	IgG
Multifokale motorische Neuropathie	GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b	IgM
Chronisch-entzündliche demyelinisierende Polyn.	GM2, GM3, GD1a, GD1b	IgM
Chronisch-ataxische Neuropathie (CANOMAD)	GM3, GD1b, GD2, GD3, GT1b, GQ1b	IgM
Akute ataxisch-sensorische Neuropathie	GD1b, GD3	IgG
Akute motorische axonale Neuropathie	GM1, GD1a	IgG
IgM Paraproteinämie, demyelinierende Neuropathie	Sulfatide	IgM (IgG)

Aufgrund der Kreuzreaktivität mit mikrobiellen Strukturen werden vor allem Anti-GM1 IgM Antikörper auch bei Gesunden gefunden. Ein isoliertes Auftreten dieser Antikörper hat somit keine Aussagekraft hinsichtlich des Vorliegens einer 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

TESTPRINZIP

Der Anti-Gangliosid Dot ist ein Immunodot zur qualitativen Bestimmung von IgG und/oder IgM Antikörpern gegen Ganglioside in humanem Serum, Plasma oder Liquor.

Jeder Anti-Gangliosid Dot Kit enthält 20 nummerierte Teststreifen (Dotstreifen). Die Dotstreifen bestehen aus einer Membran und sind jeweils mit einem Kontrollfeld (Positivkontrolle) und 12 Testfeldern versehen. Auf jedem Testfeld befindet sich je ein hoch gereinigtes Gangliosid (Sulfatide, GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b bzw. GQ1b).

Während des ersten Reaktionsschrittes reagieren die in den Patientenproben vorhandenen Antikörper mit den an der festen Phase (Membranen) immobilisierten Antigenen. Nicht gebundene Komponenten werden nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten bei 4° C unter Schütteln durch einen Waschschritt entfernt.

Die gebundenen Antikörper reagieren im zweiten Reaktionsschritt spezifisch mit anti-human-IgG bzw. anti-human IgM Antikörpern, die an Peroxidase (POD) gekoppelt sind. Die Verwendung beider Konjugate in einem Testansatz als Antikörperscreening ist möglich. Überschüssige Konjugatmoleküle werden nach 60 Minuten bei 4° C unter Schütteln von den an der festen Phase gebundenen Immunkomplexen durch einen weiteren Waschschritt entfernt.

Die Peroxidase setzt im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung in ein lilafarbenes präzipitierendes Endprodukt um, welches sich in Form einer Bande auf den Membranen niederschlägt. Diese Reaktion wird nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln durch einen Waschschritt gestoppt.

Nachdem die Streifen getrocknet sind, kann die Reaktion abgelesen werden.

PATIENTENPROBEN

Gewinnung und Lagerung

Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation isolieren. Die Verwendung von Plasma und Liquorproben im Test ist ebenfalls möglich.

Die Lagerung ist bis zu 3 Tagen bei 2 - 8 °C möglich, darüber hinaus müssen die Proben bei - 20 °C eingefroren werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden, ggf. sollte vor dem Einfrieren aliquotiert werden.

Vorbereitung und Verwendung

Im Anti-Gangliosid Dot werden die Proben mit Kühlschranktemperatur eingesetzt. Grundsätzlich sollte durch kurzes Aufschütteln eine entsprechende Homogenität gesichert werden.

TESTKOMPONENTEN für 20 x 12 Bestimmungen

A Ag	**Teststreifen** 20 Streifen mit 13 Reaktionsbanden - 12 Testfelder beschichtet mit hoch gereinigtem Gangliosiden: GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b (human), Sulfatide (bovin) - Positive Kontrolle	20 Teststreifen
B BUF	**Pufferkonzentrat, 10-fach** für je 150 ml 10x	15 ml Konzentrat weiße Kappe
C CONJ G	**IgG Konjugat, 20fach** enthält anti-human-IgG (Kaninchen) gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (POD)	1,2 ml gebrauchsfertig rote Kappe
D CONJ M	**IgM Konjugat, 20fach** enthält anti-human-IgM (Kaninchen) gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (POD)	1,2 ml gebrauchsfertig grüne Kappe
E SOLN TMB	**Substrat** 3,3`,5,5`-Tetramethylbenzidin	11 ml gebrauchsfertig blaue Kappe
F	**Inkubationswanne für 12 Teststreifen**	2 x

Zusätzlich erhältlich: REF 50031

P CONTR	**Positive Kontrolle** humanes Serum oder Plasma, positiv für Antikörper gegen Ganglioside (siehe Label) +	0,1 ml gebrauchsfertig

Zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- verstellbare Einkanal-Mikropipette 100 - 1000 µl
- verstellbare Einkanal-Mikropipette 10 - 100 µl
- Pipettenspitzen
- Kühlschrank mit der Möglichkeit zum Betrieb eines Schüttlers im Inneren oder Kühlzelle (4°C)
- Schüttler (Wippschüttler empfohlen)
- Meßzylinder
- Bechergläser
- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Filterpapier
- Plastikpinzette

Menge und Lagerung

Jede Packung Anti-Gangliosid Dot enthält Reagenzien für 20 x 12 Bestimmungen.

Das Verfallsdatum des kompletten Reagenziensatzes ist auf dem äußeren Etikett des Testbesteckes angegeben. Die Verfallsdaten der Einzelreagenzien können ggf. darüber hinausgehen und sind auf den jeweiligen Reagenzien vermerkt.

Bis zur Verwendung sind alle Reagenzien des Anti-Gangliosid Dot bei 2 - 8 °C zu lagern.

Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2 - 8 °C mindestens 2 Monate haltbar.

Vorbereitung und Verwendung

Die ersten beiden Inkubationsschritte und der erste Waschschritt laufen bei 4°C ab, hierzu müssen die benötigten Reagenzien (Puffer, Konjugat) vorgekühlt sein. Der zweite Waschschritt und die Substratinkubation laufen bei Raumtemperatur (RT) ab. Hierfür die benötigten Reagenzien (Puffer, Substrat) rechtzeitig auf RT bringen.

Die Testreifen sind in einem Folienbeutel verpackt. Benötigte Anzahl von Teststreifen mit einem Skalpell oder scharfen Messer von der Stützmembran abtrennen. Nicht gebrauchte Teststreifen vor Feuchtigkeit schützen, in den Beutel zurücklegen und diesen verschließen.

Pufferkonzentrat 10fach (1 + 9) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Für jeden Teststreifen werden 5 ml Puffer benötigt.
Beispiel:
15 ml Universalpufferkonzentrat + 135 ml destilliertes Wasser.
Die auf diese Weise verdünnte Waschpufferlösung ist bei 2 - 8 °C mindestens 30 Tage haltbar.

Alle anderen Testkomponenten sind gebrauchsfertig und bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

Substrat lichtgeschützt aufbewahren.

Reinigung der Inkubationswanne

Wanne nach Gebrauch mit einer Spülmittelverdünnung 30 min auf einem Wippschüttler inkubieren. Danach mit Wasser spülen.

Im nächsten Schritt die Wanne mit einem Alkohol (Methanol, Ethanol, Propanol) befüllen und 30 min auf einem Wippschüttler inkubieren. Danach mit Wasser spülen.

Im Folgenden die Wannenrinnen mit einem Wattestäbchen reinigen. Nach der Reinigung wird mit Aqua dest gespült und die Wanne getrocknet.

TESTDURCHFÜHRUNG

- **Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.**
- **Sämtliche Reaktionsschritte finden auf einem Schüttler / Wipp-schüttler bei mittlerer Geschwindigkeit statt.**
- **Bis zur Konjugatinkubation müssen alle Reaktions- und Waschschritte bei 4°C ablaufen, die hierfür benötigten Reagenzien (Puffer, Konjugat) müssen deshalb im Kühlschrank gelagert werden!**
- **Nach der Konjugatinkubation wird der Test bei RT durchgeführt, die hierzu benötigten Reagenzien (Puffer, Substrat) rechtzeitig auf RT bringen.**

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Teststreifen der Packung entnehmen, alle Reagenzien vor Gebrauch schütteln.
2. Für jeden Teststreifen **1,0 ml** Pufferlösung (verdünnt aus B) in der Inkubationswanne vorlegen. Teststreifen mit der bedruckten Reaktionsseite nach unten in die vorgelegte Pufferlösung legen.
3. Patientenproben zu den Teststreifen dazugeben:
   Serum/Plasma: jeweils **10 µl** (Endverdünnung 1+100)
   Liquor: jeweils **50 µl** (Endverdünnung 1+20)
4. **120 Minuten bei 4° C** unter leichtem Schütteln inkubieren
5. Dekantieren (Achtung: Die Inkubationswanne langsam umdrehen, die Lösung vorsichtig dekantieren und die verbliebene Flüssigkeit mit Filterpapier aufsaugen.), **5 Minuten bei 4° C** mit **1 ml** Pufferlösung (verdünnt aus B) unter leichtem Schütteln waschen.
6. **1 ml** Pufferlösung (verdünnt aus B) in jede Wanne pipettieren,
   IgG Nachweis: **50 µl** Konjugat C
   IgM Nachweis: **50 µl** Konjugat D
   IgG/IgM Screening: je **50 µl** Konjugat C und D dazupipettieren,
7. **60 Minuten bei 4° C** unter leichtem Schütteln inkubieren.
8. Dekantieren wie oben beschrieben, **5 Minuten** bei RT (18-25°C) mit **1 ml** Pufferlösung (verdünnt aus B) unter leichtem Schütteln waschen.
9. **0,5 ml** Substrat (E) in jede Wanne pipettieren.
10. **10 Minuten** bei RT (18-25°C) unter leichtem Schütteln inkubieren.
11. Dekantieren und **2 Minuten** bei **RT** mit **1 ml** Pufferlösung (verdünnt aus B) unter Schütteln waschen.
12. Dekantieren **2 Minuten** bei **RT** mit **1 ml** Aqua dest unter Schütteln waschen, um die Reaktion zu stoppen.
13. Die Streifen aus der Inkubationswanne nehmen und mit der Reaktionsseite nach unten auf saugfähigem Papier legen. **30 Minuten** trocknen lassen und erst dann die Reaktion ablesen.

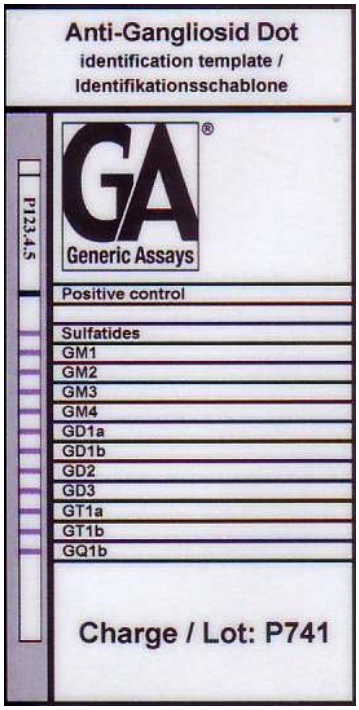
AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Auswertung der Testergebnisse erfolgt anhand der mitgelieferten Auswerteschablone, nachdem die Teststreifen getrocknet und mit handelsüblichem Pritt-Stift oder Klebefolie auf die Schablone aufgeklebt sind.

Dabei muss die Positive Kontrollbande bei ordnungsgemäßer Durch-führung des Assays und bei voller Reaktionsfähigkeit aller Reagenzien positiv ausfallen. Ist dies nicht der Fall, kann **keine** Beurteilung der Patientenseren erfolgen.

Jede Antigenbande ist mit einem spezifischen Antigen beschichtet und gibt Auskunft über das Ausmaß der spezifischen Bindung eines Antikörpers aus der jeweiligen Patientenprobe.

Mit Hilfe der chargenspezifischen Interpretationsschablone (siehe Abbildung nachfolgend) erfolgt die Beurteilung des Ergebnisses der Reaktion. Die auf der Schablone dargestellten Intensitäten der Antigenbanden dienen als Cut-off für die Beurteilung positiv-negativ.



Positives Ergebnis:

Eine Patientenprobe gilt als positiv bezüglich eines Antikörpers, wenn die Farbentwicklung auf dem entsprechenden Testfeld eine intensivere Färbung als die Vergleichsbande auf der chargenspezifischen Interpretations- Evaluierungsschablone liefert.

Negatives Ergebnis:

Eine Patientenprobe gilt als negativ, wenn die Färbung einer Antigenbande eine Farbentwicklung schwächer oder gleich stark wie die Vergleichsbande der Interpretations- Evaluierungsschablone liefert.

Validierung:

Zur Beurteilung der Testergebnisse muss die positive Kontrollbande eine deutliche Farbentwicklung liefern.

Grenzen der Methode

Gesunde Individuen sollten mit dem Anti-Gangliosid Dot negativ bestimmt werden. Jedoch können IgM Antikörper gegen Ganglioside wegen der Kreuzreaktivität mit mikrobiellen Antigenen auch bei Gesunden auftreten. Weiterhin können bei asymptomatischen Probanden positive Autoantikörperkonzentrationen gefunden werden.

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnoseerstellung sollten vom Arzt alle möglichen klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

ASSAY – SCHEMA

Anti-Gangliosid Dot (5003)

Bis zu Schritt 7 werden alle Reaktionsschritte bei 4°C durchgeführt; hierfür benötigte Reagenzien (Teststreifen, Puffer, Konjugat) und Patientenproben müssen gekühlt eingesetzt werden. Die nachfolgenden Schritte laufen bei Raumtemperatur ab; benötigte Reagenzien rechtzeitig auf Raumtemperatur bringen!

1.	Testreagenzien und die benötigte Anzahl von Teststreifen der Packung entnehmen	
2.	1 ml Puffer (verdünnt aus B) in die Inkubationswanne geben, Teststreifen mit der Reaktionsseite nach unten in die Pufferlösung legen	
3.	Patientenproben dazu pipettieren:	Serum/Plasma: 10 µl (Endverdünnung 1+100) Liquor: 50 µl (Endverdünnung 1+20)
4.	Inkubieren	unter leichtem Schütteln, 120 Minuten, 4°C
5.	Dekantieren, Waschen der Streifen	bei 4°C unter leichtem Schütteln 5 Minuten mit 1 ml Puffer (verdünnt aus B)
6.	Pipettieren **1 ml** Pufferlösung (verdünnt aus B) in jede Wanne, hinzufügen von: IgG Nachweis: **50 µl** Konjugat C IgM Nachweis: **50 µl** Konjugat D IgG/IgM Screening: je **50 µl** Konjugat C und D	
7.	Inkubieren	unter leichtem Schütteln, 60 Minuten, 4°C
8	Dekantieren, Waschen der Streifen	unter leichtem Schütteln, RT (18-25°C), 5 Minuten mit 1 ml Puffer (verdünnt aus B)
9.	Pipettiere 0,5 ml Substrat (E) in die entsprechende Wanne	
10.	Inkubieren	unter leichtem Schütteln, 10 Minuten, RT (18-25°C)
11.	Dekantieren und Waschen der Streifen	unter Schütteln, RT, 2 Minuten mit 1 ml Puffer-lösung (verdünnt aus B),
12.	Dekantieren, Stoppen der Reaktion durch Waschen	unter Schütteln, RT, 2 Minuten mit 1 ml Aqua dest.
13.	Teststreifen auf saugfähigem Papier 30 Minuten trocknen lassen, Reaktion ablesen	

ALLGEMEINE HINWEISE und VORSICHTSMASSNAHMEN

- Dieser Reagenziensatz ist zum in-vitro-Gebrauch bestimmt und muss von geschultem Laborpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten.
- Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden.
- Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt.
- Dies gilt auch für die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller zur Komplettierung eines geöffneten Testbestecks.
- Die empfohlene Lagertemperatur angebrochener Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2 - 8 °C.
- Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen Kathon (1,0 % v/v) als Konservierungsmittel. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.
- Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten. Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:
  - Nicht essen, trinken oder rauchen!
  - Nie mit dem Mund pipettieren!
  - Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Seren tragen!
  - Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!
- Wir empfehlen, mittels laborinterner Kontrollseren eigene Qualitätskontrollen durchzuführen (s.a. Eichordnung, Bundesgesetzblatt I, S. 1657, 1988 sowie Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, Dt. Ärzteblatt 98, Heft 42, S. A2747-59, 2001).