



ImmuGlo™ Anti-Myelin Associated Antibody (anti-MAG) IFA

IVD

PRODUCT INSERT

REF Code 1172 48 Determinations

INTENDED USE

For the screening and detection by indirect immunofluorescence (IF) of 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-Barré syndrome*, *Chronic Inflammatory Demyelinating 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 neuropathies:

- 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)¹⁻⁶.

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 heterogeneous 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 IF technique is a sensitive method for the screening and detection of these anti-nerve myelin associated proteins and ganglioside autoantibodies. If the specimen yields no immunoreactivity by immunofluorescence the result is reported as negative. The specificity of the specimen, determined positive by IFA, should be confirmed by Western immunoblotting (anti-MAG) or by ELISA (anti-gangliosides).

PRINCIPLES OF PROCEDURE

Antibodies to MAG and other peripheral nerve glycoconjugates are detected by indirect immunofluorescence using a primate peripheral nerve substrate. Patient sera are incubated on the section to allow binding of antibodies to the specific antigens of the substrate. Any immunoglobulins and other serum protein not bound to the tissue sections are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgM class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled antihuman IgM conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of antibodies of a specificity is determined by their specific reactions to the nerve tissue. The anti-MAG antibodies

specifically stain the periaxonal oligodendroglial membrane, the Schwann cell periaxonal membranes, and the inner and the outer mesaxons of the nerve sheath.

PRODUCT INFORMATION

Storage and Preparation

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

Materials Provided

ImmuGlo™ anti-MAG IFA **REF** 1172

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

8 x	SORB SLD 6	6 well primate peripheral nerve substrate slides
1 x 0.5 ml	CONTROL + MAG *	MAG Positive Control
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	IgM-CONJ FITC *	Goat antihuman IgM FITC Conjugate. Ready to use. Protect from light.
1 x 60 ml	BUF *	Sample Diluent.
2 vials	BUF WASH	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Mounting Medium. Do not freeze.
1 x 1.0 ml	EVANS	Evan's Blue Counterstain.
1 x 12	COVER SLD	Coverslips. Reconstitute to one liter each.

* Contains < 0.1% NaN₃

Materials Required But Not Provided

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

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HbsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials²².

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

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

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

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

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

1. Dilute each patient serum **1:10** with the Buffered Diluent provided (0.1 ml serum + 0.9 ml Diluent). **Do not** dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for **10-15 minutes**. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50 µl) of the **Negative Control** to well #1. Similarly apply **1 drop** of **Positive Control** to well #2. Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur pipette, apply **1 drop** of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides **30 minutes** at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10 ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use a wash bottle. Transfer slide immediately into a Coplin jar filled with PBS and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides.
8. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the **Conjugate** dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50 µl) to each well. Repeat process with all remaining slides.
9. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate **30 minutes** at room temperature.
10. Remove a slide from the incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides. If desired, **2-3 drops** of Evans blue counterstain may be added to the final wash.
NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
11. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **While slide is still wet mount the coverslip.** Place **3 drops** of the Mounting Medium evenly spaced on a coverslip placed on a paper towel and invert the slide onto the coverslip. To remove any air bubbles gently apply pressure along the edge of the coverslip. Avoid any movement of the coverslip. Repeat process with all remaining slides
12. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of **200x** or greater.

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

B: End Point Determination (Titration)

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

Preparation of Serial Dilutions

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

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

Quality Control

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

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

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

RESULTS

Results of the test for anti-nerve antibodies should be reported as negative (<10) or positive with titer. For anti-MAG antibodies, read for staining of the periaxonal oligodendroglial membrane, the Schwann cell periaxonal membranes, and the inner and the outer mesaxons of the nerve sheath as shown in Figure 1 at the end of this document.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

The presence of two or more antibodies in a serum which are reactive with the substrate may cause an interference in their detection by immunofluorescence resulting in either, a failure to detect anti-MAG antibodies, or suppression of the titer. In addition, other distinct reaction patterns on the peripheral nerve sections may also be observed in sera positive for anti-SGPG, anti-P0, anti-MOG and anti-PMP22. Such reactions may not be easily distinguishable from anti-MAG due to the fact that they share the HNK1 epitope. It is recommended that all positive samples be confirmed for antibody specificity by western immunoblotting techniques.



ImmuGlo™ Anti-MAG Anticorps

IVD

REF

1172

48 Determinations

Pour la détection par l'immunofluorescence indirecte (IF) principalement de anti-myelin associé glycoprotéines (anti-MAG) et d'autres autoanticorps de glycolipide en sérum humain.

GENERALITES

Les réponses autoimmunes du système nerveux périphérique, identifiées en tant que *neuropathies périphériques*, sont des manifestations liées aux autoanticorps contre de divers glycoconjugués neuraux. Ces neuropathies peuvent être aiguës, chroniques, impliquent la dégénération d'axonal, ou la démyélination. Des neuropathies autoimmunes peuvent être encore divisées en gammopathies monoclonales et polyneuropathies inflammatoires de polyclonal comme le syndrome de *Guillain-Barré*, la *CIDP*, la *neuropathie motrice multifocale* (MMN), et les *neuropathies paraneoplasiques*. Dans ces maladies, il y a un chevauchement significatif des autoantigènes impliqués qui négocient le mécanisme pathogène. Les autoanticorps spécifiques de nerf périphérique suivants sont trouvés dans ces neuropathies :

- a) **glycoprotéine associée de anti-myelin (MAG)**
- b) **les glycolipides anti-acide comme le sulfoglucuronyle paragloboside (SGPG)**
- c) **anti-gangliosides**
- d) **le myelin associé protéines de anti-compact comme P0, P2, et myelin protéine périphérique 22 (PMP22)** ¹⁻⁶.

L'épitope (HNK1) identifié par les autoanticorps humains de magnétique est un oligosaccharide sulfaté. Cet même épitope est partagé par SGPG, P0 et PMP227. Neuropathies liées à anti-MAG avec le paraprotéinémie d'IgM sont habituellement un groupe hétérogène de la maladie, lentement progressif avec l'évidence de démyélination et un degré variable de la perte d'axonale habituellement lié à l'ataxie de démarche. De tous les cas périphériques de neuropathie avec le paraprotéinémie d'IgM, 50% possèdent les anticorps⁸ de anti-MAG. On le perçoit que ces autoanticorps pourraient interférer le processus de myélination, l'entretien de myélin, ou des interactions de cellules d'axone-Schwann. Par conséquent, la détection de ces autoanticorps est utile pour le clinicien, car elle suggère le démyélination actif en neuropathie périphérique.

La IF technique est une méthode sensible pour le criblage et la détection de ces protéines de anti-nerf autoanticorps associés par myélin et autoanticorps de ganglioside. Si le spécimen ne rapporte aucune immunoréactivité par l'immunofluorescence le résultat est rapporté en tant que négatif. La spécificité du spécimen, positif déterminé par IFA, devrait être confirmée par Western immunoblot (anti-MAG) ou par ELISA (anti-gangliosides).

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des anticorps anti-MAG et d'autres glycoconjuguates périphériques de nerf sont détectés par l'immunofluorescence indirecte en utilisant un substrat de nerf périphérique de primat. Le sérum du patient est incubé sur des nerf périphérique, ce qui permet la fixation des autoanticorps avec le substrat. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgM humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps fixés de classe IgM. Les réactivités sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. La présence des anticorps est déterminée par leurs réactions spécifiques au nerf. Les anticorps de anti-MAG souillent spécifiquement la membrane oligodendrogliale de periaxonale, les membranes periaxonales de cellules de Schwann, et les mesaxons intérieurs et externes de la gaine de nerf.

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

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

Matériel fourni

ImmuGlo™ Anti-MAG Antibody IFA **REF** 1172

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

8x	SORB SLD 6	Lames 6 puits de nerf périphérique de primat
1 x 0,5 ml	CONTROL + MAG *	Contrôle positif MAG , sérum humain avec de la BSA
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Contrôle négatif , sérum humain avec de la BSA
1 x 5 ml	IgM-CONJ FITC *	Conjugué FITC anti-IgM humaines avec de la BSA. Maintenir à l'abri de la lumière
1 x 60 ml	BUF *	Diluant sérum , avec de la BSA
2 vials	BUF WASH	Tampon phosphate salin (PBS) . Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Milieu de montage . Ne pas congeler
1 x 1,0 ml	EVANS	Contre colorant Bleu d'Evans
1 x 12	COVER SLD	Lamelles couvre-lames

* Contient < 0.1% NaN₃

Matériel nécessaire mais non fourni

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

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic in vitro. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et trouvé non réactif en antigène de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti VIH1, anti VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹⁴.

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

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

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

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

MODE OPÉRATOIRE

A. Dépistage

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

5. Avec une micropipette ou une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder les puits.
 6. Recouvrir la chambre humide et incuber les lames 30 minutes à température ambiante.
 7. Sortir une lame de la chambre humide. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette et environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un bécher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
 8. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Déposer la lame dans la chambre humide. Déposer immédiatement 1 goutte de conjugué dans chaque puits.
 9. Répéter les étapes 7 et 8 avec chaque lame.
 10. Recouvrir la chambre humide et incuber 30 minutes à température ambiante.
 11. Sortir une lame de la chambre humide. Plonger la lame dans un bécher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Si une contre-coloration est souhaitée, ajouter 2-3 gouttes de Bleu d'Evans dans le dernier bain de lavage. Répéter les opérations avec toutes les lames.
- NOTE :** Le lavage inexact peut mener à la fluorescence accrue de fond.
12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est humide.
 13. Déposer doucement 3 gouttes de milieu de montage dans la lamelle couvre-lame également et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.
 14. Répéter les étapes 12 et 13 avec chaque lame.
 15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement X200 ou plus.

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

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

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

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

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne donne pas d'image fluorescente sur les nerfs, tandis qu'avec le contrôle positif on obtient une fluorescence de ces structures.

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

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

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Des résultats de l'essai pour des anticorps de anti-nerf devraient être rapportés en tant que négatifs (< 10) ou positif avec le titre. Pour des anticorps de anti-MAG, lisez pour la souillure de la membrane oligodendrogliale de periaxonale, des membranes periaxiales de cellules de Schwann, et des mesaxons intérieurs et externes de la gaine de nerf comme représenté sur le schéma 1 à la fin de ce document.

LIMITES D'UTILISATION

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

La présence de deux anticorps ou plus dans un sérum qui sont réactifs avec le substrat peut causer une interférence dans leur détection par l'immunofluorescence ayant pour résultat, un manque de détecter des anticorps de anti-MAG, ou la suppression du titre. En outre, on peut également observer d'autres modèles distincts de réaction sur les sections périphériques de nerf en sérums positifs pour anti--SGPG, anti-P0, anti-MOG et anti-PMP22. De telles réactions peuvent ne pas être distinguables de anti-MAG étant donné qu'elles partagent l'épitope HNK1. On lui recommande que tous les échantillons positifs soient confirmés pour la spécificité d'anticorps par des techniques d'immunoblot.



ImmuGlo™ Anti-Mielin Asoció Anticuerpo (anti-MAG) IFA

IVD

REF

Code 1172

48 determinaciones

Para la investigación y la detección por inmunofluorescencia indirecta (IF) del glicoproteínas anti-mielin asoció (anti-MAG) y otros autoanticuerpos del glicolípido en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las respuestas autoinmunes del sistema nervioso periférico, reconocidas como *neuropatías periféricas*, son manifestaciones asociadas a los autoanticuerpos contra varios glicoconjugados de los nervios. Estas neuropatías pueden ser agudas, crónicas, implican la degeneración del axón, o el demielinación. Las neuropatías autoinmunes se pueden dividir más a fondo en gammopatías monoclonal y polineuropatías inflamatorias del polyclonal como el síndrome de *Guillain-Barré*, la *polineuropatía inflamatoria crónica* (CIDP), la *motor neuropatía multifocal* (MMN), y las *neuropatías paraneoplásico*. En estas enfermedades, hay un traslape significativo de los autoantígenos implicados que median el mecanismo patógeno. Los autoanticuerpos específicos del nervio periférico siguiente se encuentran en estas neuropatías:

- a) **glicoproteína asociada del anti-mielin (MAG),**
- b) **los glicolípido anti-ácido como del sulfoglucuronil paragloboside (SGPG),**
- c) **anti-gangliosidos**
- d) **las proteínas anti-compacto asociadas del mielin como de P0, de P2, y de la proteína periférica 22 del mielin (PMP22)** ¹⁻⁶.

El epitope (HNK1) reconocido por los autoanticuerpos humanos del MAG es un oligosacárido sulfatado. Este mismo epitope es compartido por SGPG, P0 y PMP22 ⁷. Neuropatías asociado a anti-MAG con el paraproteinemia de IgM es generalmente un grupo heterogéneo de la enfermedad, lentamente progresista con la evidencia del demielinación y un grado variable de pérdida axonal asociado generalmente a la ataxia del paso. De todos los casos periféricos de la neuropatía con el paraproteinemia de IgM, los 50% poseen los anticuerpos anti-MAG ⁸. Se percibe que estos autoanticuerpos pudieron interferir con el proceso del demielinación, con mantenimiento del mielin, o con interacciones de la célula del axon-Schwann. Por lo tanto, la detección de estos autoanticuerpos es útil para el clínico, pues sugiere el demielination activo en una neuropatía periférica.

La técnica IF es un método sensible para la investigación y la detección de estas proteínas del anti-nervio y autoanticuerpos anti-mielin asociados del gangliosidas. Si el espécimen no rinde ningún inmunoreactivación por inmunofluorescencia el resultado se divulga como negativa. La especificidad del espécimen, positivo resuelto de IFA, se debe confirmar por Western immunoblot (anti-MAG) o por ELISA (anti-gangliosidas).

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los anticuerpos al mag y a otros glicoconjugados periféricos del nervio son detectados por inmunofluorescencia indirecta usando un sustrato periférico del nervio del primate. Los sueros pacientes se incuban en la sección para permitir atar de anticuerpos a los antígenos específicos del sustrato. La cualquier inmunoglobulina y la otra proteína del suero no limitada a las secciones del tejido fino son quitadas aclarando. Los anticuerpos encuadrados de la clase de IgM son detectados por la incubación del sustrato con la FITC conjugado de IgM. Las reacciones se observan debajo de un microscopio de la fluorescencia equipado de los filtros apropiados. La presencia de anticuerpos de una

especificidad es determinada por sus reacciones específicas al nervio. Los anticuerpos anti-MAG manchan específicamente la membrana oligodendroglial del periaxonas, las membranas periaxonal de la célula de Schwann, y los mesaxons internos y externos de la envoltura del nervio.

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

Almacenamiento y preparación

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

Materiales Suministrados

ImmuGlo™ EMA IFA REF 1172

El kit contiene los suficientes reactivo para realizar 48 determinaciones.

8x	SORB SLD 6	Portaobjetos de 6 pocillos con substrato nervio periférico.
1 x 0,5 ml	CONTROL + MAG *	Control positivo de EMA, suero humano
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Control negativo, suero humano
1 x 5 ml	IgM-CONJ FITC *	Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgM anti humana con BSA. Proteger de la luz
1 x 60 ml	BUF *	Diluyente de la muestra con BSA
2 viales	BUF WASH	Fosfato salino tamponado (PBS). Disolver cada vial en 1 litro
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Medio de preparación. No congelar
1 x 1,0 ml	EVANS	Colorante de contraste azul de Evans
1 x 12	COVER SLD	Cubreobjetos

* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN₃

Material necesario, pero no suministrado

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

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*. Todos los componentes de derivados sanguíneos humanos han sido ensayados respecto a la presencia de HbsAg, VHC, VIH-1 y 2 y el virus linfotrofo de células T humanas (VLTH-I), siendo negativos en los ensayos necesarios según la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos). Todas las muestras de suero

y los derivados sanguíneos humanos deben tratarse como un material potencialmente peligroso, independientemente de su origen. En consecuencia, deben seguirse unas prácticas de laboratorio adecuadas durante el almacenamiento, dispensación y eliminación de dicho material ¹⁴.

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

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

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

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

PROCEDIMIENTO

Método de ensayo

A. Detección sistemática

1. Diluir 1:10 el suero de cada paciente con el diluyente de la muestra suministrado (0,1 ml de suero + 0,9 ml del diluyente). No diluir los Controles Positivo o Negativo. Guardar el suero no diluido para la determinación del título de anticuerpos si los resultados son positivos.
2. Permitir que los pocillos de los portaobjetos que contienen el substrato se equilibren a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraer con cuidado los portaobjetos sin tocar el substrato.
3. Etiquetar los portaobjetos y colocarlos en una cámara de incubación cubierta con toallas de papel humedecidas con agua para evitar la desecación.
4. Invertir el vial cuentagotas y presionar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 μl) del Control Negativo en el pocillo n° 1. De forma similar, aplicar una gota del Control Positivo en el pocillo n° 2. Evitar llenar demasiado los pocillos.
5. Con el empleo de una micropipeta o una pipeta Pasteur, colocar 1 gota del suero diluido del paciente (aproximadamente 50 μl) en los restantes pocillos. Evitar llenar demasiado los pocillos.
6. Tapar la cámara de incubación e incubar los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Quitar la tapa de la cámara de incubación. Coger el portaobjetos por el extremo y lavar suavemente con 10 ml de PBS mediante el empleo de una pipeta o lavar el portaobjetos en un vaso de precipitado lleno de PBS. No emplear un frasco de lavado. Transferir inmediatamente el portaobjetos al frasco de Coplin y dejarlo durante 10 minutos. Repetir el proceso con todos los portaobjetos restantes.
8. Extraer el portaobjetos del frasco de Coplin. Secar el extremo del portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Colocar el portaobjetos en la cámara de incubación, Invertir inmediatamente el vial cuentagotas del Conjugado y apretar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 μl) en cada pocillo.
9. Repetir las etapas 7 y 8 con cada portaobjetos.

10. Tapar la cámara de incubación. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraer el portaobjetos del incubador. Sumergir el portaobjetos en un vaso de precipitado con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Colocar el portaobjetos en una cubeta de tinción llena con PBS durante 10 minutos. Al final del lavado puede añadirse, si se desea, 2-3 gotas de colorante de contraste azul de Evans. Repetir el proceso con los portaobjetos restantes. NOTA: un lavado inadecuado puede aumentar fluorescencia del fondo.
12. Extraer el portaobjetos de la cubeta de tinción. Secar el portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Para evitar que se seque el portaobjetos, realizar inmediatamente, mientras el portaobjetos todavía está húmedo, el proceso descrito en el apartado 13.
13. Añadir 3 gota del Medio de Preparación uniformemente en cubreobjetos y colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos. Evitar la aplicación de una presión excesiva y el movimiento lateral del cubreobjetos.
14. Repetir las etapas 12 y 13 con cada portaobjetos.
15. Examinar el desarrollo de fluorescencia específica en un microscopio de fluorescencia a 200x o más aumentos.

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

B. Determinación del punto de valoración (titulación)

Los sueros positivos durante el ensayo pueden valorarse de forma adicional, etapas 5- 13, para determinar su titulación. Cada ensayo debe incluir un control positivo y negativo. Realizar diluciones seriadas dobles a partir de 1:10. El título es el valor recíproco de la dilución más elevada que produzca una reacción positiva.

Preparación de las diluciones seriadas

Numerar cuatro tubos del 1 al 6. Añadir 0,9 ml del diluyente de la muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 4. Pipetear 0,2 ml del suero no diluido en el tubo 1 y mezclar minuciosamente. Transferir 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezclar meticulosamente. Continuar transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente tras la mezcla y, de este modo, conseguir las diluciones ilustradas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4
Suero	0,2 ml			
	+			
Diluyente tamponado	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Transferencia		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilución final	1:10	1:20	1:40	1:80 etc.

CONTROL DE CALIDAD

En cada serie de ensayos debe incluirse un control positivo y negativo. El control negativo no debe mostrar fluorescencia específica del nervio se lía; por el contrario, el control positivo debe tener una intensidad de tinción igual o superior a 1+. Cuando no se obtienen los resultados esperados, debe repetirse el ensayo. Los resultados anómalos con los controles pueden producirse por:

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

RESULTADOS

Los resultados de la prueba para los anticuerpos del anti-nervio se deben divulgar como negativo (< 10) o positivo con título. Para los anticuerpos anti-MAG, leer para mancharse de la membrana oligodendroglial del periaxonas, de las membranas periaxonal de la célula de Schwann, y de los mesaxons internos y externos de la envoltura del nervio según lo demostrado en el cuadro 1 en el extremo de este documento.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

La presencia de dos o más anticuerpos en un suero que sean reactivos con el substrato puede causar una interferencia en su detección por inmunofluorescencia dando por resultado, una falta de detectar los anticuerpos anti-MAG, o la supresión del título. Además, otros patrones distintos de la reacción en las secciones periféricos del nervio se pueden también observar en los sueros positivos para el anti-SGPG, anti-P0, anti-MOG y anti-PMP22. Tales reacciones pueden no ser fácilmente distinguibles de anti-Mag debido al hecho de que comparten el epitope HNK1. Se recomienda que todas las muestras positivas sean confirmadas para la especificidad del anticuerpo por técnicas del inmunoblot.

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) 1999.
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.

Photo 1. Positive anti-MAG Reaction on Peripheral Nerve Substrate

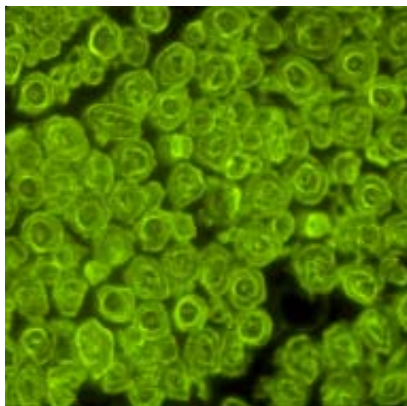


Table 1. Incidence of anti-Nerve (anti-MAG) Antibodies in Neuropathies¹⁰

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

Table 2. 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

For technical assistance please contact:



IMMCO Diagnostics, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé
EMERGO Group, Inc.
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com

REV.MAY2009

Document No. PI4172