BÜHLMANN
GanglioCombi® *Light* ELISA

con marcatori enzimatici IgG/IgM misto, IgG e IgM

Determinazione di anticorpi anti-gangliosidi mediante ELISA
(GM1, GD1b e GQ1b)

Per uso diagnostico *in vitro*

EK-GCL-S 96 test

Data di pubblicazione: 2023-08-17
Versione A1

Produttore
BÜHLMANN Laboratories AG
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Svizzera
Tel.: +41 61 487 12 12
Fax: +41 61 487 12 34
info@buhlmannlabs.ch

ITALIANO

USO PREVISTO

BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgG e/o IgM contro selezionati antigeni/epitopi neuronali in campioni di siero. I risultati del test possono essere usati a supporto della diagnosi di neuropatie periferiche autoimmuni insieme ad altre evidenze cliniche e di laboratorio.
Solo per uso di laboratorio.

APPLICAZIONE PREVISTA

I tre marcatori enzimatici, forniti nel kit, permettono tre diversi algoritmi di analisi:

1. L'analisi con la miscela coniugata di IgG/IgM (di seguito denominata "miscela") permette di indagare la presenza di anticorpi anti-neuronali suggestivi di una neuropatia autoimmune.
2. L'analisi con coniugati singoli di IgG e/o IgM permette la determinazione dell'isotipo degli anticorpi.
3. Come controllo di laboratorio, lo screening iniziale dei campioni con la miscela (opzione 1) può essere seguito dalla differenziazione di campioni positivi alla miscela usando i singoli coniugati di IgG e IgM (opzione 2), se necessario.

PRINCIPIO DEL TEST

BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA permette la misurazione selettiva degli anticorpi anti-gangliosidi nel siero. La piastra per microtitolazione è rivestita di gangliosidi: GM1, GD1b e GQ1b.
Il siero del paziente, i controlli e il calibratore vengono aggiunti ai pozzetti della piastra per microtitolazione. Dopo 2 ore di incubazione a 2 – 8 °C e i passaggi di lavaggio, gli anticorpi di rilevazione (anti-IgG/IgM, anti-IgG, anti-IgM) coniugati con perossidasi di rafano (HRP) rilevano gli anti-gangliosidi legati ai gangliosidi immobilizzati sulla piastra. Dopo altre 2 ore di incubazione e altri passaggi di lavaggio si aggiunge TMB (tetrametilbenzidina, il substrato cromogenico della HRP, che determina la formazione del colore blu), quindi la reazione viene bloccata (e il suo colore vira al giallo). L'assorbanza è misurata alla lunghezza d'onda di 450 nm.
L'assorbanza misurata è proporzionale al titolo degli anticorpi presenti in un determinato campione. I titoli degli anticorpi sono espressi mediante rapporti % del calibratore e possono essere assegnati a diverse categorie (negativi, zona grigia, positivi).

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Reagente	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropiastra pre-rivestita con gangliosidi	12 strisce da 8 pozzetti con supporto	B-GCL-MP	Pronto all'uso
Foglio sigillante per piastre	3 pezzi		
Tampone di lavaggio concentrato (10x) con conservanti	1 flacone x 100 mL	B-GCO-WB	Diluire con 900 mL di acqua deionizzata
Tampone di incubazione con conservanti	1 flacone x 100 mL	B-GCO-IB	Pronto all'uso
Calibratore liofilizzati con conservanti	1 fiala	B-GCO-CA	Aggiungere 1.5 mL di tampone di incubazione
Controllo negativo, basso e medio[1] liofilizzati con conservanti	3 fiale	B-GCO-CONSET	Aggiungere 1.5 mL di tampone di incubazione
Marcatore enzimatico IgG/IgM misto anticorpo anti-IgG e anti-IgM umani coniugato con HRP in una matrice tampone con conservanti	1 fiala x 11 mL	B-GCO-ELGM	Pronto all'uso
Marcatore enzimatico IgG anticorpo anti-IgG umaneconiugato con HRP in una matrice tampone con conservanti	1 fiala x 11 mL	B-GCO-ELG	Pronto all'uso
Marcatore enzimatico IgM anticorpo anti-IgM umane coniugato con HRP in una matrice tampone con conservanti	1 fiala x 11 mL	B-GCO-ELM	Pronto all'uso
Substrato TMB TMB in tampone citrato	1 fiala x 11 mL	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione di stop Acido solforico 0,25 M	1 fiala x 11 mL	B-STS	Pronto all'uso **Agente corrosivo**

Tabella 1

[1] I controlli contengono livelli lotto-specifici di anticorpi anti-GM1. Per i valori effettivi di OD media e rapporto %, consultare la scheda dati-QC aggiuntiva.

CONSERVAZIONE E VALIDITA DEI REAGENTI

Reagenti sigillati / non aperti	
Conservare a 2-8 °C. Non usare i reagenti dopo la data di scadenza stampata sulle etichette.	
Reagenti aperti / ricostituiti	
Micropiastra	Riporre subito le strisce di pozzetti non utilizzate dentro la busta di alluminio contenente l'essiccante e risigillarla premendo lungo tutta la chiusura ermetica. Conservare a 2-8 °C per un periodo massimo di 6 mesi.
Tampone di lavaggio diluito	Conservare a 2-8 °C per un periodo massimo di 6 mesi.
Tampone di incubazione	
Marcatori enzimatici	
Substrato TMB	
Controlli	
Calibratore	
Soluzione di stop	Conservare a 18-28 °C per un periodo massimo di 6 mesi.

Tabella 2

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

- Pipettatori di precisione con puntali monouso: da 10 µL, 20 µL, 100 µL e 1000 µL
- Provette di polistirene o polipropilene monouso per la preparazione delle diluizioni dei campioni
- Cilindro da 1000 mL per la diluizione del tampone di lavaggio
- Sistema di lavaggio per micropiastre
- Carta assorbente
- Agitatore di micropiastre
- Lettore di micropiastre per misurare l'assorbanza a 450 nm

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Precauzioni per la sicurezza

- Il calibratore e i controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Sebbene i reagenti siano stati testati per HBV, HCV e HIV1/2 e siano risultati negativi, vanno considerati come potenziali vettori di infezioni e quindi maneggiati secondo le buone pratiche di laboratorio (GLP) adottando le precauzioni del caso.
- I componenti contenuti in questo kit sono classificati conformemente al regolamento (CE) n. 1272/2008:
  - La soluzione di stop contiene acido solforico (conc. 2,5-5%), pertanto i reagenti possono provocare irritazione cutanea (H315), grave irritazione oculare (H319) ed essere corrosivi per i metalli (H290).
  - Il calibratore, i controlli e i marcatori enzimatici contengono cloridrato di 2-metil-4-isotiazolin-3-one (conc. ≥0,0015%), pertanto i reagenti possono provocare reazioni allergiche cutanee (H317).
  - Il tampone di incubazione e il tampone di lavaggio contengono gentamicina solfato per cui i reagenti possono provocare una reazione allergica cutanea (H317).
- Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi, la pelle o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare con abbondante acqua; in caso contrario possono manifestarsi irritazione/ustioni.
- I reagenti e le sostanze chimiche devono essere trattati come rifiuti pericolosi in conformità con le linee guida o le normative nazionali in materia di sicurezza dei materiali a rischio biologico.

Precauzioni tecniche

- Prima di eseguire il test leggere attentamente le istruzioni. Le prestazioni del test risultano negativamente compromesse quando i reagenti vengono diluiti in modo scorretto, modificati o conservati in condizioni diverse rispetto a quelle specificate in queste istruzioni per l'uso.

Procedura del test ELISA

Temperatura dei reagenti

- Preparare i reagenti prima di iniziare la procedura analitica. Passaggi 3-9: I reagenti usati nei passaggi 3-9 devono essere freddi (2-8 °C) e mantenuti freddi durante la pipettatura e il lavaggio. Raccomandazione: preparare il tampone di lavaggio il giorno prima dell'esecuzione del test e metterlo in frigorifero per tutta la notte.
- Effettuare tutti i passaggi di lavaggio con tampone di lavaggio freddo (2-8 °C).
- Portare il substrato TMB e la soluzione di stop a temperatura ambiente (18-28 °C) all'inizio della procedura analitica.

Passaggi di lavaggio

- I passaggi di lavaggio 3, 6 e 9 sono fondamentali per rimuovere residui derivanti dal processo di produzione e/o, potenzialmente, anticorpi non legati presenti nei pozzetti.
- È vivamente raccomandato usare la "modalità piastra" di un sistema di lavaggio automatico, cioè ogni fase della procedura (erogazione/aspirazione) viene eseguita in sequenza su tutte le strisce prima che lo strumento prosegua con il ciclo di lavaggio successivo.
- Assicurarsi che tutti i pozzetti siano completamente vuoti dopo l'ultimo ciclo di lavaggio.

Incubazione del substrato

- Passaggio 11: Agitare le piastre per microtitolazione durante l'incubazione con il substrato. A seconda del modello di agitatore per piastre, consigliamo 400-600 rpm. La soluzione deve muoversi nei pozzetti ma non fuoriuscire.

Componenti del kit

- Non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza stampata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti di lotti diversi.
- Adottare tutte le precauzioni possibili per evitare contaminazioni incrociate tra i reagenti, i campioni o tra i pozzetti.
- I micropozzetti non possono essere riutilizzati.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La procedura richiede rispettivamente <0,1 mL di sangue o <50 µL di siero.

Prelevare il sangue in provette semplici per prelievo venoso senza alcun additivo, evitando l'emolisi. Preparare il siero seguendo le istruzioni del fabbricante. Far decantare il siero.

I campioni di siero possono essere conservati a 2-8 °C per non più di otto settimane, a 28 °C per non più una settimana e a ≤-20 °C per 16 settimane. I campioni congelati devono essere scongelati e miscelati a fondo mediante agitazione delicata o capovolgimento prima dell'uso.
Consigliamo di preparare aliquote dei campioni di siero prima di congelarli al fine di evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.

PROCEDURA DEL TEST

Sono possibili due opzioni:

(1) Determinazione di isotipi misti (IgG e IgM): aggiungere la miscela di marcatori enzimatici al passaggio 7

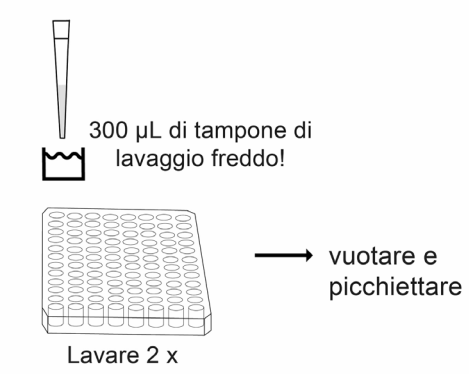
(2) Determinazione degli isotipi IgG o IgM: aggiungere il marcatore enzimatico IgG o il marcatore enzimatico IgM al passaggio 7

Nota: portare il substrato TMB a temperatura ambiente (18-28 °C).

1. Diluire i campioni 1:50 con tampone di incubazione. Usare, ad esempio, 10 µL di siero + 490 µL di tampone di incubazione freddo! (2-8 °C). Miscelare a fondo agitando su vortex e lasciare i campioni diluiti, il calibratore e i controlli ricostituiti a 2-8 °C per 30 minuti prima di pipettare (fare riferimento ai passaggi 4a e b).
2. Preparare un supporto per piastre con un numero sufficiente di strisce per testare il numero richiesto di calibratori, controlli e campioni. Staccare dal supporto le strisce in eccesso e risigillarlo immediatamente nella busta di alluminio insieme con l'essiccante. Conservare in frigorifero.

Nota: nei passaggi da 3 a 9 usare reagenti freddi.

3. Lavare due volte i pozzetti usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio freddo! (2-8 °C) per pozzetto. Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente per rimuovere completamente il liquido rimanente.



Nota: procedere immediatamente ai passaggi successivi.

4a. Pipettare 100 µL di calibratore nel pozzetto A1 (fare riferimento alla figura 1A per l'opzione 1 e alla figura 1B per l'opzione 2).

4b. Pipettare 100 µL di controllo medio nel pozzetto B1, di controllo basso nel pozzetto A2 e di controllo negativo nel pozzetto B2 (fare riferimento alla figura 1A o 1B).

Nota per l'opzione 1: se vengono usate più di tre strisce per ogni analisi, il calibratore e i controlli possono essere testati in duplicato (vedere la figura 1A).

Nota per l'opzione 2: il calibratore e i controlli devono essere analizzati separatamente per gli isotipi IgG e IgM (vedere la figura 1B).

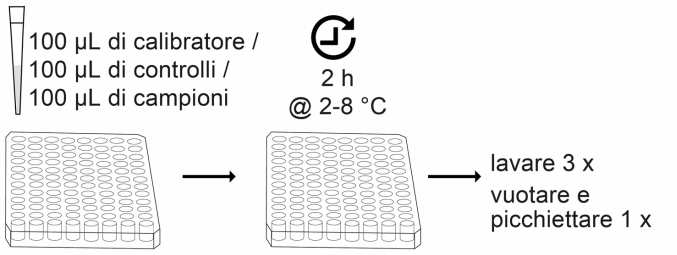
4c. Pipettare 100 µL di campione diluito 1 nei pozzetti C1-E1 (fare riferimento alla figura 1A o alla figura 1B).

4d. Pipettare 100 µL di campione diluito 2 nei pozzetti F1-H1 (fare riferimento alla figura 1A o alla figura 1B).

4e. Pipettare 100 µL dei campioni diluiti 3-24 (per l'opzione 1) o 3-12 (per l'opzione 2) nei pozzetti successivi (fare riferimento alla figura 1A o 1B).

Nota per l'opzione 2: ripetere la pipettatura dei campioni 1-12 nello stesso ordine nei pozzetti rimanenti per l'analisi con il secondo isotipo.

5. Coprire la piastra con un foglio sigillante e incubarla per 2 ore (±5 min) a 2-8 °C (non scuotere la piastra).
6. Togliere il foglio sigillante. Vuotare i pozzetti e lavarli tre volte usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio freddo! (2-8 °C) per pozzetto. Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente per rimuovere completamente il tampone di lavaggio.



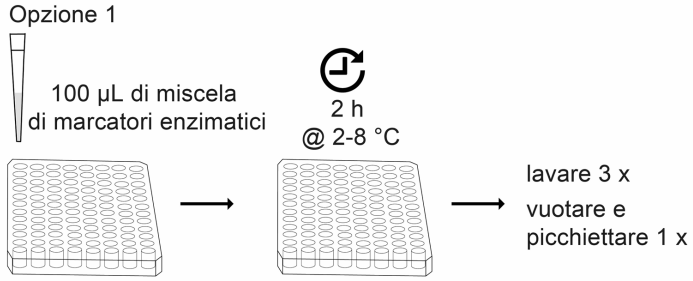
Per l'opzione 1: Determinazione degli isotopi misti

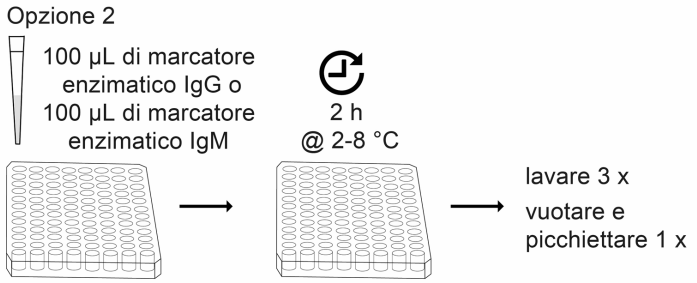
7. Aggiungere 100 µL di miscela ai pozzetti.

Per l'opzione 2: Determinazione degli isotipi IgG o IgM

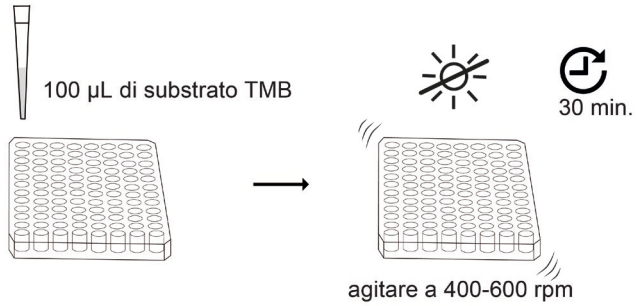
7'. Aggiungere 100 µL di marcatore enzimatico IgG o IgM ai pozzetti rispettivi (fare riferimento alla figura 1B).

8. Coprire la piastra con un foglio sigillante e incubarla per 2 ore (±5 min) a 2-8 °C (non scuotere la piastra).
9. Togliere il foglio sigillante. Vuotare i pozzetti e lavarli tre volte usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio freddo! (2-8 °C) per pozzetto. Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente.

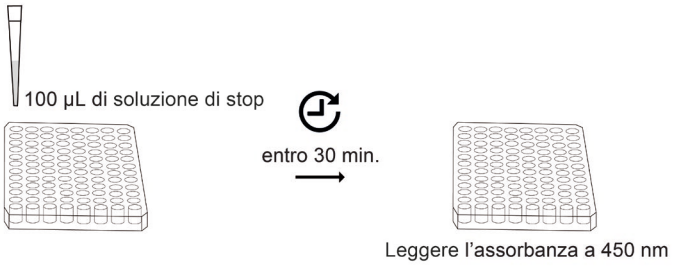




10. Aggiungere 100 µL di soluzione del substrato TMB (equilibrata a temperatura ambiente) in ogni pozzetto.
11. Coprire la piastra con un foglio sigillante, proteggerla dalla luce e incubarla su un agitatore per piastre impostato a 400-600 rpm a 18-28 °C per 30±2 minuti.



12. Aggiungere 100 µL di soluzione di stop in tutti i pozzetti. Rimuovere le bolle d'aria con un puntale per pipette. Procedere al passaggio 13 entro 30 minuti.
13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore di piastre per microtitolazione.



CONTROLLO DI QUALITA

Per un uso efficace del prodotto è necessaria un'approfondita comprensione di queste istruzioni per l'uso. Si otterranno risultati attendibili soltanto attraverso l'uso di tecniche di laboratorio precise e seguendo accuratamente queste istruzioni per l'uso.
Il kit BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA è fornito con tre controlli: negativo, basso e medio. Ai controlli sono stati assegnati i range di valori (% Ratio) indicati sulla scheda dati-QC allegata a ogni kit. Per ottenere risultati validi, le misurazioni dei controlli devono rientrare nei range dei valori indicati.
Oltre ai controlli del kit, consigliamo l'uso di combinazioni di sieri per il controllo qualità interno.
Per il calibratore è raccomandato un valore minimo di OD_{450nm} di 1,2.
Le caratteristiche prestazionali devono rientrare nei limiti stabiliti. Se le prestazioni del test non soddisfano i limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) controllo della temperatura (conservazione a 2-8 °C dei reagenti usati nei passaggi 3-9); ii) precisione dei termometri e dei dispositivi di pipettatura e misurazione dei tempi; iii) impostazioni del lettore ELISA; iv) date di scadenza dei reagenti; v) condizioni di conservazione e di incubazione; vi) colore della soluzione del substrato TMB (deve essere incolore); vii) purezza dell'acqua; viii) metodi di aspirazione e lavaggio.

STANDARDIZZAZIONE E TRACCIABILITÀ METROLOGICA

Per la misurazione degli anticorpi anti-gangliosidi in campioni di siero non sono disponibili materiali o procedure di riferimento riconosciuti a livello nazionale o internazionale. Il test BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA è standardizzato rispetto a un materiale di riferimento stabilito internamente. I valori dei calibratori sono assegnati in base a un protocollo di trasferimento dei valori (rif. 1) per garantire la tracciabilità metrologica e sono indicati nelle unità arbitrarie "rapporto %".
L'intervallo di confidenza al 95% dell'incertezza composta dei calibratori del prodotto è risultato pari al 29,3% per gli anticorpi IgG e al 37,6% per gli anticorpi IgM.

CALCOLO DEI RISULTATI DEL TEST

1. Registrare l'assorbanza (OD) a 450 nm per ogni pozzetto (calibratore, controlli e campioni).
2. Se vengono effettuate più misurazioni del calibratore e dei controlli, eseguire una media dei valori.

I risultati sono espressi come rapporto tra l'assorbanza dei campioni e l'assorbanza (media) del calibratore.

Isotipi misti

$$\text{Rapporto \%:} \frac{\text{assorbanza dei campioni o dei controlli}}{\text{assorbanza del calibratore}} \times 200$$

Isotipi IgG e IgM

$$\text{Rapporto \%:} \frac{\text{assorbanza dei campioni o dei controlli}}{\text{assorbanza del calibratore}} \times 100$$

Programmi per calcolare i risultati come rapporto % sono disponibili sulla maggior parte dei lettori di micropiastre.

Nota: i risultati presentati nelle tabelle 5 e 6 sono esempi e sono forniti solo a scopo dimostrativo.

LIMITAZIONI

- Risultati elevati del rapporto % (>100%) per gangliosidi singoli possono determinare una reattività crociata con altri gangliosidi presenti nello stesso campione. La reattività crociata mostrerà tipicamente un'elevata variabilità tra i saggi. L'interpretazione dei risultati deve quindi essere effettuata solo insieme a un esperto/specialista.
- A causa della poli-reattività degli anticorpi autoimmuni e delle differenze nella prevalenza geografica, i risultati dei test devono essere usati solo a supporto dell'interpretazione clinica della neuropatia da parte di un esperto/specialista in combinazione con il quadro clinico del paziente (rif. 2).
- Questo test non è stato convalidato per la plasmaferesi.
- Le immunoglobuline endovenose (IVIg) possono influenzare i risultati del test.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO E CUT-OFF

L'intervallo di riferimento del test BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA è stato stabilito conformemente alle linee guida C28-A3 del CLSI con 120 campioni di siero di soggetti auto-dichiaratisi sani. La frequenza di distribuzione degli anticorpi anti-gangliosidi in donatori di sangue normali è stata classificata in categorie di titoli: negativi (rapporto <30%), zona grigia (rapporto 30-50%) e positivi (rapporto >50%). I risultati sono riassunti nella tabella 7. Il valore di cut-off per la positività è un rapporto del 50%.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Antigene	IgG/IgM misti IgG IgM		
	Valori (rapporto %)		
	<30	30-50	>50
GD1b	Negativo	Ripetere il test su un prelievo ad un tempo successivo	Positivo
GQ1b			
GM1			

Tabella 3

I risultati del test devono essere interpretati congiuntamente alle informazioni ottenute dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Precisione intra-laboratorio: CV 5,7 - 13,2%
La precisione intra-laboratorio è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI usando il seguente disegno standardizzato: 20 giorni x 2 analisi x 2 replicati. Sono stati analizzati tre (3) campioni aggregati di siero del paziente. I risultati sono riassunti nella tabella 8.

Riproducibilità: CV 7,7 - 19,1%
La riproducibilità è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI applicando il seguente disegno di studio: 3 strumenti/lotti/operatori x 5 giorni x 5 replicati. Sono stati analizzati tre (3) campioni aggregati di siero del paziente. I risultati sono riassunti nella tabella 9.

Limite del bianco (LoB) ≤ limite di rilevazione (LoD): rapporto ≤30%
Il LoB e il LoD sono stati determinati secondo le linee guida EP17-A2 del CLSI usando l'analisi non parametrica. I risultati sono riassunti nella tabella 10.

Effetto "hook" delle concentrazioni elevate
Non è stata osservata alcuna limitazione dell'intervallo di misurazione a causa dell'effetto "hook" dovuto alla concentrazione elevata.

Reattività incrociata
Non è stata osservata alcuna reattività crociata sistematica per campioni di pazienti con diverse malattie autoimmuni (tabella 11) e di pazienti con altri disturbi neurologici (tabella 12).

PRESTAZIONI CLINICHE

Le prestazioni cliniche sono state valutate mediante analisi descrittiva della letteratura scientifica sottoposta a revisione paritaria. Cinque (5) studi hanno riguardato le prestazioni cliniche di BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA nella diagnosi delle neuropatie periferiche autoimmuni (rif. 3-7). I risultati delle analisi e i dettagli degli studi sono forniti rispettivamente nella tabella 4 e nella tabella 13.

N. di neuropatie periferiche	160 (102 GBS pediatriche, 14 CIDP, 44 GBS)
N. di controlli	375 (104 DC, 254 NC, 135 HC)
Sensibilità (IC 95%)	57,0% (38,6 – 75,4%)
Specificità (IC 95%)	79.8% (66,8 – 93,2%)

Tabella 4

GBS, sindrome di Guillain-Barré; DC, controllo non neurologico della malattia; NC, controllo neurologico; HC, controllo sano; CIDP, polineuropatia demielinizzante infiammatoria cronica; IC, intervallo di confidenza

SOSTANZE INTERFERENTI

La sensibilità del test a farmaci orali e iniettabili e a sostanze endogene è stata valutata secondo le linee guida EP07-A3 del CLSI. Nei risultati, un bias ≥ ± 20% è stato considerato un'interferenza.

Non sono state rilevate interferenze con le seguenti sostanze fino alle concentrazioni indicate: immunoglobulina endovenosa (20 mg/mL), rituximab (3 mg/mL), cladribina (273 ng/mL), interferone alfa-2a (49,5 ng/mL), gabapentin (26,7 µg/mL), ibuprofene (0,22 mg/mL), clorambucile (1,96 µg/mL), prednisone (99 ng/mL), prednisolone (1,2 µg/mL), fattore reumatoide (2340 UI/mL), emoglobina (10 mg/mL), emolizzato (10 mg/mL), trigliceridi (15 mg/mL), bilirubina coniugata (20 µg/mL), bilirubina non coniugata (150 µg/mL).

TABELLE E FIGURE

Impostazione della piastra per microtitolazione: Marcatore IgG/IgM misto

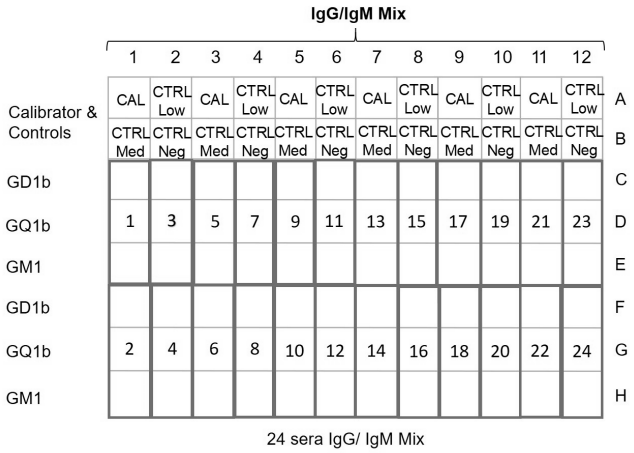


Figura 1A: ≤ 24 sieri/kit (1 MP/kit)

Impostazione della piastra per microtitolazione: Marcatori IgG e IgM

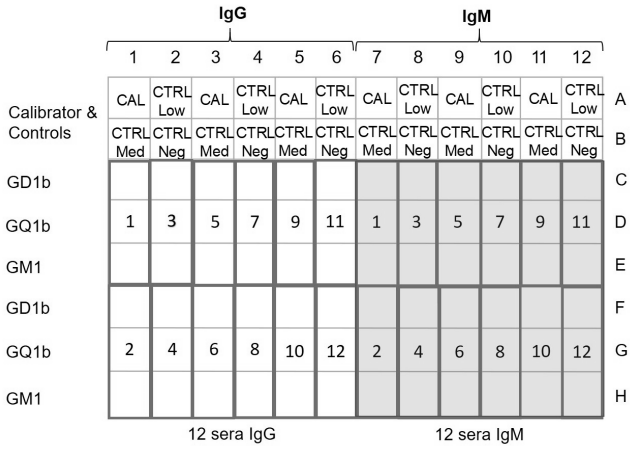


Figura 1B : 2 profili/siero, ≤ 12 sieri/kit (1 MP/kit)

Esempio di risultati

A Marcatore IgG/IgM misto

B-GCO-ELGM	Assorbanza (OD450)	Rapporto [%]
Calibratore	1,415 1,445	
Media calibratore	1,430	200
Controllo medio	0,498 0,482	69 67
Media controllo medio	0,490	68
Controllo basso	0,195 0,191	27 26
Media controllo basso	0,193	27
Controllo negativo	0,090 0,100	12 14
Media controllo negativo	0,095	13
Campione 1 GM1	0,544	76
Campione 1 GD1b	0,745	104
Campione 1 GQ1b	0,090	13

Tabella 5

B Marcatori IgG e IgM

Marcatore enzimatico	Assorbanza (OD450)		Rapporto [%]	
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM	IgG	IgM	IgG	IgM
Calibratore	1,789 1,833	2,576 2,527		
Media calibratore	1,836	2,551	100	100
Controllo medio	1,267 1,237	1,743 1,764	69 67	68 69
Media controllo medio	1,252	1,753	68	69
Controllo basso	0,567 0,584	0,938 0,942	30 32	37 37
Media controllo basso	0,571	0,940	31	37
Controllo negativo	0,061 0,051	0,098 0,095	3 3	4 4
Media controllo negativo	0,056	0,097	3	4
Campione 1 GM1	0,171	3,814	9	150
Campione 1 GD1b	1,021	0,354	56	14
Campione 1 GQ1b	0,378	0,208	21	8

Tabella 6

Intervallo di riferimento

Analita	% donatori di sangue normali nelle categorie			Limite di riferimento (IC 90%)
	Rapporto <30%	Rapporto 30-50%	Rapporto >50%	
anti-GM1 IgG	99,2	0,8	0,0	16 (13,0 – 29,8)
anti-GM1 IgM	95,8	3,3	0,8	24 (14,3 – 40,3)
anti-GM1 IgGM	95,0	4,2	0,8	34 (23,3 – 49,5)
anti-GD1b IgG	97,5	1,7	0,8	21 (14,5 – 33,0)
anti-GD1b IgM	99,2	0,0	0,8	15 (6,3 – 15,5)[F] 9 (6,4 – 54,7)[M]
anti-GD1b IgGM	95,0	3,3	1,7	30 (22,3 – 71,6)
anti-GQ1b IgG	97,5	2,5	0,0	24 (14,6 – 33,4)
anti-GQ1b IgM	99,2	0,8	0,0	8 (6,2 – 17,8)
anti-GQ1b IgGM	95,0	4,2	0,8	31 (23,1 – 46,7)

F Sottogruppo di sesso femminile. *M* Sottogruppo di sesso maschile

Tabella 7

TABELLE E FIGURE

Precisione intra-laboratorio

Descrizione del campione			Precisione intra-laboratorio			
Analita	**Marcatore enzimatico (isotipo)**	**Categoria prevista [Rapporto %]**	**N**	**Media [Rapporto %]**	**DS [Rapporto %]**	**CV [%]**
Ab anti-GM1	IgM	30-50	80	48	3,5	7,2
		>50	80	91	6,2	6,8
	IgG	30-50	80	40	5,1	12,9
		>50	80	106	13,1	12,4
Ab anti-GQ1b	IgM	30-50	80	45	2,6	5,7
		>50	80	85	6,7	7,8
	IgG	30-50	80	43	5,7	13,2
		>50	80	80	6,9	8,6

Tabella 8

Riproducibilità

Descrizione del campione			Riproducibilità			
Analita	**Marcatore enzimatico (isotipo)**	**Categoria prevista [Rapporto %]**	**N**	**Media [Rapporto %]**	**DS [Rapporto %]**	**CV [%]**
Ab anti-GM1	IgM	30-50	75	51	4,9	9,7
		>50	75	94	7,2	7,7
	IgG	30-50	75	39	5,6	14,5
		>50	75	106	17,1	16,1
Ab anti-GQ1b	IgM	30-50	75	48	3,9	8,2
		>50	75	92	9,9	10,7
	IgG	30-50	75	42	8,1	19,1
		>50	75	78	12,0	15,4

Tabella 9

LoD e LoB

Analita	LoB [rapporto %]	LoD [rapporto %]
Ab Anti-GM1 IgM	5	21
Ab Anti-GM1 IgG	6	15
Ab Anti-GQ1b IgM	3	17
Ab Anti-GQ1b IgG	8	18

Tabella 10

Reattività incrociata

Anticorpo assegnato	Diagnosi	#
Anticorpo anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA)	Vasculite	3
	Altri (campioni indicati come ANCA positivi)	10
Anticorpi anti-nucleo (ANA)	Lupus eritematoso sistemico	5
	Artrite reumatoide	9
	Sindrome di Sjogren	6
	Altri (campioni indicati come ANA positivi)	3
Anticorpi anti-tireoglobulina (anti-Tg)	Tiroidite autoimmune	5
Anticorpi anti-ribonucleoproteine	Malattie miste del tessuto connettivo	1
Anti-GQ1b, anti-GM1, anti-GD1b	Neuropatie periferiche autoimmuni	1
Anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina e anti-tirosinchinasi muscolo-specifica	Miastenia gravis	7

Tabella 11

Neuropatie periferiche	**#**
Alcolica	1
Diabetica	5
Disturbi che imitano neuropatie periferiche	**#**
Sclerosi laterale amiotrofica (SLA)	15
Sarcoidosi	4
Macroglobulineamia di Waldenstrom (WM)	4
Malattia di Chagas	5

Tabella 12

Prestazioni cliniche

Studio	Controlli positivi (casi)	Controlli negativi	Epitopo	Sensibilità	Specificità
Hashemilar et al., 2014	GBS pediatrica (n = 45)	DC (n = 35)	GM1	0,51	0,89
			GQ1b	0,56	0,74
Sharma et al., 2011	GBS pediatrica (n = 57)	NC (n = 42)	GM1	0,82	0,33
		DC (n = 35)			0,83
Khandelwal et al., 2006	GBS (n = 13)	HC (n = 19)	GM1	0,31	0,74
Uetz-von Allmen et al., 1998	GBS, CIDP (n = 19, 14)	NC (n = 100)	GM1	0,30	0,93
		HC (n = 110)			0,95
Spatola et al., 2016	GBS (MFS) (n = 12)	DC (n = 34)	GQ1b	0,92	0,97

Tabella 13

GBS, sindrome di Guillain-Barré; DC, controllo non neurologico della malattia; NC, controllo neurologico; HC, controllo sano; MFS, sindrome di Miller-Fisher; CIDP, polineuropatia demielinizzante infiammatoria cronica

BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA

Piastra per microtitolazione pre-rivestita

↓ *lavare 2 x con ≥300 µL di tampone di lavaggio (freddo!)*

100 µL di calibratore, controlli o campioni di siero (1:50)

↓ *incubare 2 ore (±5 min) a 2-8 °C*
lavare 3 x con ≥300 µL di tampone di lavaggio (freddo!)

aggiungere 100 µL di marcatore(i) enzimatico(i)

↓ *incubare 2 ore (±5 min) a 2-8 °C*
lavare 3 x con ≥300 µL di tampone di lavaggio (freddo!)

aggiungere 100 µL di substrato TMB (a temperatura ambiente)!

↓ *incubare 30 minuti (±2 min) a 18-28 °C*
su un agitatore per piastre a ~400-600 rpm

aggiungere 100 µL di soluzione di stop (a temperatura ambiente)!

➡ **Leggere l'assorbanza a 450 nm (entro 30 minuti)**

TEMPO PER OTTENERE UN RISULTATO: 4,5 ore

RIFERIMENTI

1. Blirup-Jensen, S., Johnson, A. M. & Larsen, M. Protein standardization V: Value transfer. A practical protocol for the assignment of serum protein values from a Reference Material to a Target Material. *Clin. Chem. Lab. Med.* **46,** 1470–1479 (2008).

2. Bourque, P. R. et al. Autoimmune peripheral neuropathies. *Clinica Chimica Acta* **449**, 37–42 (2015).

3. Hashemilar, M. et al. Evaluating the status of antiganglioside antibodies in children with Guillain-Barré syndrome. *Neuroimmunomodulation* **21**, 64–68 (2013).

4. Sharma, M. B. et al. The presence of Mycoplasma pneumoniae infection and GM1 ganglioside antibodies in Guillain-Barré syndrome. *J. Infect. Dev. Ctries*. **5**, 459–464 (2011).

5. Uetz-von Allmen, E. et al. Antiganglioside GM1 antibodies and their complement activating capacity in central and peripheral nervous system disorders and in controls. *Eur. Neurol*. **39**, 103–110 (1998).

6. Spatola, M., Du Pasquier, R., Schluep, M. & Regeniter, A. Serum and CSF GQ1b antibodies in isolated ophthalmologic syndromes. *Neurology* **86**, 1780–1784 (2016).

7. Khandelwal, D. et al. IgM anti-GM1 antibody titers in patients with monomelic amyotrophy. *Neurol. India* **54**, 399–401 (2006).

REGISTRO DELLE MODIFICHE

Data	Versione	Modifica
2023-08-17	A1	Modifica dell'*Uso previsto* e del nome del prodotto Eliminazione del ganglioside GM2 e introduzione del ganglioside GT1a Riformulazione del *Principio del test* con le categorie dei titoli "negativi, zona grigia e positivi" Nuove stabilità dei reagenti durante l'uso Aggiornamento del capitolo *Avvertenze e precauzioni* Revisione dei capitoli *Raccolta e conservazione dei campioni, Procedura del test,* e *Standardizzazione e tracciabilità metrologica* Riformulazione del capitolo *Controllo di qualità* Aggiornamento del capitolo *Limitazioni* Revisione dei capitoli *Intervalli di riferimento e cut-off, Caratteristiche prestazionali,* e *Sostanze interferenti* Introduzione del capitolo *Prestazioni cliniche* Revisione dei capitoli *Riferimenti* e *Simboli* Aggiunta del numero di ente notificato al marchio CE – procedura di valutazione della conformità conformemente al Regolamento sui dispositivi diagnostici in vitro (IVDR) 2017/746

SEGNALAZIONE DI INCIDENTI NEGLI STATI MEMBRI UE

Si prega di segnalare immediatamente al produttore e alle autorità competenti del proprio paese eventuali incidenti gravi avvenuti in relazione all'uso di questo dispositivo.

DANNI DOVUTI ALLA SPEDIZIONE

Informare il proprio distributore se il prodotto è stato ricevuto danneggiato.

SIMBOLI

BÜHLMANN utilizza i simboli e i segni elencati e descritti in ISO 15223-1. Inoltre, vengono utilizzati i seguenti simboli e segni:

Simbolo	Spiegazione
MP	Micropiastra
BUF WASH 10X	Tampone di lavaggio concentrato (10x)
BUF INC	Tampone di incubazione
CAL	Calibratore
CONTROL -	Controllo negativo
CONTROL L	Controllo Basso
CONTROL M	Controllo medio
EL IgG	Marcatore enzimatico IgG
EL IgM	Marcatore enzimatico IgM
EL MIX	Marcatore enzimatico IgG/IgM misto
SUBS TMB	Substrato TMB
SOLN STOP	Soluzione di stop

CE 0123