



BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA

with enzyme labels IgG/IgM Mix, IgG and IgM

Detection of anti-ganglioside
auto-antibodies by ELISA
(GM1, GD1b, and GQ1b)

EK-GCL-S 96 wells

Revision date: 2017-09-21

ENGLISH

INTENDED USE

BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA, is an *in vitro* diagnostic test intended to detect antibodies against defined relevant neural antigens GM1, GD1b and GQ1b (IgG and IgM) in serum samples from patients with suspected peripheral neuropathies with an unknown etiology. It allows quantitative classification of results into titre categories and serves as an aid to diagnosis of neuropathies (ref. 1-7).

INTENDED APPLICATION

With regard to the 3 different enzyme labels, the device components allow three application options:

1. Testing with the IgG/IgM mix conjugate allows to screen for the presence of antibodies and indicate a possible autoimmune neuropathy.
2. Testing with individual IgG and/or IgM conjugates allows antibody isotype determination.
3. For laboratory work-up initial sample screening using the IgG/IgM enzyme label mix (option 1), may be followed by differentiation of mix-positive samples using individual IgG and IgM conjugates (option 2) after prior consultation with a clinician/referring neurologist.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA is based on the enzyme-immunometric assay technique. The wells of the provided microtiter plate are coated with gangliosides: GM1, GD1b and GQ1b.

Calibrator, controls, and patient sera are incubated in the microtiter wells and anti-ganglioside antibodies present in the samples bind to the immobilized gangliosides. After washing off unbound substances, the antibodies are detected with horseradish-peroxidase (HRP) labelled antibodies against human IgG and/or IgM. Following a second washing step in which unbound enzyme label is removed, a substrate solution containing tetramethylbenzidine (TMB) is added. A blue colour develops in proportion to the amount of antibodies bound to the immobilized gangliosides. Colour development is stopped by adding an acidic stop solution (diluted sulphuric acid) which turns the blue solution into yellow. The intensity of the colour is measured at 450 nm.

The measured absorbance is proportional to the titre of antibodies present in a given sample. The titres of antibodies are expressed as % ratios of the calibrator and can be assigned to titre categories (negative, grey zone, positive, strongly positive).

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Microtiter Plate precoated with gangliosides	12 x 8 wells	B-GCL-MP	Ready to use
Plate Sealer	3 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10X) with preservatives	1 bottle 100 mL	B-GCO-WB	Dilute with 900 mL of deionized water
Incubation Buffer with preservatives	1 bottle 100 mL	B-GCO-IB	Ready to use

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Calibrator Lyophilized with preservatives	1 vial	B-GCO-CA	Add 1.5 mL of Incubation Buffer
Negative, Low and Medium Control Lyophilized with preservatives	3 vials	B-GCO-CONSET	Add 1.5 mL of Incubation Buffer
Enzyme Label IgG Anti-human IgG Ab conjugated to HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 mL	B-GCO-ELG	Ready to use
Enzyme Label IgM Anti-human IgM Ab conjugated to HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 mL	B-GCO-ELM	Ready to use
Enzyme Label Mix Anti-human IgG and IgM Ab conjugated to HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 mL	B-GCO-ELGM	Ready to use
TMB Substrate TMB in citrate buffer	1 vial 11 mL	B-TMB	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	1 vial 11 mL	B-ST5	Ready to use Corrosive agent

Table 1

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Sealed / Unopened Reagents	
All sealed / unopened kit components are stable at 2-8 °C until the expiration date printed on the labels.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Microtiter Plate	Return unused strips immediately to the aluminium pouch containing the desiccant packs and reseal along the entire edge of zip-seal. Store for up to 4 months at 2-8 °C.
Diluted Wash Buffer	Store for up to 4 months at 2-8 °C.
Calibrator	Store for up to 4 months at 2-8 °C.
Controls	Do not freeze!
Incubation Buffer	Store at 2-8 °C until expiration date printed on the labels.
Enzyme Labels	
TMB Substrate	
Stop Solution	Store at 18-28 °C until expiration date printed on the labels.

Table 2

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes with disposable tips: 20 µL, 100 µL and 1000 µL pipettes.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 mL cylinder for the reconstitution of the wash buffer.
- Squeeze bottle for wash buffer or automatic microtiter plate washer.
- Blotting paper.
- Orbital shaker for microtiter plates.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.

PRECAUTIONS

Safety precautions

- Both, calibrator (B-GCO-CA) and controls (B-GCO-CONSET) of this kit contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions.
- **Stop solution:** The stop solution (B-STs) contains sulfuric acid (0.25 M). The reagent is an irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothes. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.
- **Reagents:** Avoid contact of reagents with the skin, eyes, or mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with generous amounts of water; otherwise, irritation / burns can occur.
- Unused solution should be disposed of according to local state and federal regulations.

Technical precautions

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- **Residues in the microtiter plate wells** result from the production process. They are removed in the washing step (assay procedure step 3) and do not affect the results.
- **Prepare reagents before starting the assay procedure.** Reagents used in **steps 3-9** must be cold (2-8 °C) and kept cold while pipetting and washing. Put the TMB substrate at room temperature (18-28 °C).
- **Steps 3-9:** Use cold (2-8 °C) reagents for all these steps and keep them cold while pipetting. Recommendation: Prepare the wash buffer the evening before performing the assay and place it into the fridge overnight.
- **Wash steps 3, 6 and 9:** The wash steps are crucial for removing residues in the microtiter plate wells resulting from the production process (step 3) as well as any unbound antibodies (steps 6 and 9).
 - Always perform the wash steps with cold (2-8 °C) wash buffer.
 - Make sure that all wells are completely empty after the last washing cycle.
- **Step 9:** Adjust TMB substrate to room temperature (18-28 °C) before using it.
- **Step 11:** Shake the microtiter plates during the incubation with substrate. Depending on the orbital plate shaker, we recommend 400-600 rpm. The solution should move in the wells but must not spill over.
- If an automated washer is used, "plate mode" should be chosen so that dispensing is performed sequentially on all strips before aspirating.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.

- Every effort should be made to ensure that no cross contamination occurs between reagents, samples or between wells.
- Microwells cannot be re-used.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- The procedure requires <0.1 mL of blood or <50 µL of serum, respectively.
- Refer to page 7 to learn about the interference of haemolyzed, lipemic or icteric samples.
- Collect blood into plain tubes (no anti-coagulant), avoid haemolysis, leave to clot for one hour, centrifuge for 10 minutes at approximately 1500 x g at room temperature (18-28 °C), collect the serum.
- We recommend freezing aliquots of patient samples if you need to store samples in order to avoid repeated freezing / thawing.
- Store serum samples at ≤-20 °C up to 4 months. For long-term storage we recommend -70 °C (samples are stable for >1 year). Frozen samples should be thawed and vortexed thoroughly prior to use.

ASSAY PROCEDURE

You can choose between three basic options:

- (1) Detection of IgG/IgM mix-isotypes: step 4a-4e and 7
- (2) Detection of IgG and IgM isotypes: step 4a'-4f' and 7'
- (3) Two step approach: Option 1 → autoimmune antibody positive samples → Option 2.

Note: Equilibrate TMB substrate to room temperature (18-28 °C)

1. **Dilute** all patient samples to be investigated 1:50 with incubation buffer. Use 30 µL of serum + 1470 µL (cold: 2-8 °C!) incubation buffer. Mix by vortexing and leave diluted samples as well as reconstituted calibrator and controls for 30 minutes at 2-8 °C prior to pipetting (refer to step 4a and 4b).
2. **Prepare a plate-frame** with the required number of strips to test the patient samples. Reseal the remaining strips in the foil pouch together with the desiccant packs **immediately**. Store refrigerated.

Note: Use cold reagents in steps 3 to 9.

3. Wash coated wells twice using at least 300 µL of cold! wash buffer per well. Empty wells and tap plate firmly onto blotting paper to remove remaining liquid completely.

Note: Immediately proceed to the next steps.

Option 1: Detection of IgG/IgM mix-isotypes

- 4a. Calibrator: Pipet 100 µL of calibrator into the well A1 (refer to figure 1A).
- 4b. Controls: Pipet 100 µL of medium control into well B1, of low control into well A2 and of negative control into well B2 (refer to figure 1A).

Note: If more than three strips per run are used, calibrator and controls can be tested in duplicates (see figure A).

- 4c. Patient serum: Pipet 100 µL of diluted patient serum 1 into wells C1-E1 (refer to figure 1A).

4d. Patient serum: Pipet 100 µL of diluted patient serum 2 into wells F1-H1 (refer to figure 1A)

4e. Pipet 100 µL of diluted patient sera 3-24 into subsequent wells (refer to figure 1A).

Option 2: Detection of IgG isotypes

4a'. Calibrator: Pipet 100 µL of calibrator into the well A1 (refer to figure 1B).

4b'. Controls: Pipet 100 µL of medium control into well B1, of low control into well A2 and of negative control into well B2 (refer to figure 1B).

Note: If more than three strips per isotype are used, calibrator and controls can be tested in duplicates (see figure 1B).

4c'. Patient serum: Pipet 100 µL of diluted patient serum 1 into wells C1-E1 (refer to figure 1B).

4d'. Patient serum: Pipet 100 µL of diluted patient serum 2 into wells C1-H1 (refer to figure 1B).

4e'. Pipet 100 µL of diluted patient sera 3-12 into subsequent wells.

Detection of IgM isotypes.

4f'. Repeat steps 4a'-4e' using subsequent wells or a new microtiter plate if necessary (refer to figure 1B).

For options 1 and 2: Sample incubation and washes

5. Cover the plate with a plate sealer and incubate for 2 hours ±5 minutes at 2-8 °C (do not shake the plate).

6. Remove plate sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µL of cold wash buffer (2-8 °C) per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper in order to remove washing buffer completely.

For option 1: Detection of IgG/IgM mix-isotype

7. Add 100 µL of enzyme label IgG/IgM mix to the wells.

For option 2: Detection of IgG and IgM isotypes

7'. Add 100 µL of enzyme label IgG or IgM to the respective wells (refer to figure 1B).

For option 1 and 2: Incubation with enzyme labels, washes, detection

8. Cover the plate with a plate sealer and incubate for 2 hours ±5 minutes at 2-8 °C (do not shake the plate).

9. Remove plate sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µL of cold wash buffer (2-8 °C) per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.

Note: Adjust TMB substrate solution to room temperature (18-28 °C).

10. Add 100 µL of TMB substrate solution to each well.

11. Cover plate with a plate sealer, incubate plate on an orbital plate shaker at 400-600 rpm for 30 ±2 minutes at 18-28 °C. Protect the plate from direct light.

12. Add 100 µL of stop solution to all wells. Proceed to step 13 within 30 minutes.

13. Read absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.

QUALITY CONTROL

A good understanding of this instruction for use is necessary to obtain reliable results. These will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following the instruction for use. Since there is no control serum for anti-ganglioside antibodies commercially available, we recommend using a positive, and negative serum pool for internal quality control. A minimal OD value of 1.2 is recommended for the calibrator. All controls must be within the established expected ranges (% ratio). The expected ranges of the controls are lot-specific and indicated in the QC data sheet. Performance characteristics should be within established limits. If these characteristics are not in conformity with established limits and repetition excludes handling failures, check the following issues: i) Have all reagents, used in step 3-10, been kept at 2-8 °C? ii) accuracy of pipets, thermometers, and timers, iii) settings of ELISA washer and reader, iv) expiration date of the reagents v) storage and incubation conditions vi) colour of the TMB substrate solution (should be colourless) and vii) purity of the water.

STANDARDIZATION

The calibrator included in this kit has been calibrated against internal reference material. It has been adjusted to 100 % ratio.

RESULTS AND CALCULATION

Calculation of results:

1. Record absorbance (OD) at 450 nm for each well (calibrator, controls and patient samples).
2. Average the duplicate calibrator and control values (if available).
3. Results are expressed as ratio of absorbance of samples and the (averaged) absorbance of the calibrator.

IgG/IgM Mix isotypes

$$\% \text{ Ratio: } \frac{\text{absorbance of samples or controls}}{\text{absorbance of calibrator}} \times 200$$

IgG and IgM isotypes

$$\% \text{ Ratio: } \frac{\text{absorbance of samples or controls}}{\text{absorbance of calibrator}} \times 100$$

Programs to calculate results as % ratio are available on most microplate readers.

Note: Results presented in tables 7 and 8 are examples. Calibrator and controls must be used in each individual assay.

LIMITATIONS

1. It is recommended that grey zone and positive results obtained with enzyme label IgG/IgM mix be first discussed with a clinician/referring neurologist prior to further isotype determination with individual IgG and IgM enzyme labels.
2. Dominant auto-immune responses may be accompanied by cross-reactivity with other assayed gangliosides. The cross-reactivity will typically show high inter-assay variation and may be clinically non-relevant. The interpretation of results should therefore only be made together with an expert/specialist.
3. Due to poly-reactivity of auto-immune antibodies (ref. 6) and differences in geographical prevalence, assay results should only be used to support the clinical interpretation of the neuropathy by an expert/specialist in combination with the patient's clinical picture.
4. The BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA has not been validated for plasmapheresis samples.

INTERPRETATION OF RESULTS

Corresponding limitations, if applicable, are indicated by numbers in superscript.

	Isotype: IgG/IgM Mix		
Titre Category / Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negative	Refer to limitations ¹	Refer to limitations ¹
GQ1b			
GM1			

Table 3

	Isotype: IgG		
Titre Category / Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negative	Retest at a later time point	Positive
GQ1b			
GM1			

Table 4

	Isotype: IgM		
Titre Category / Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negative	Retest at a later time point	Positive
GQ1b			
GM1			

Table 5

REFERENCE INTERVALS AND CUT-OFF RATIOS

In co-operation with the institutions mentioned below, a cut-off of 50 % has been established. Values <30 % have been clearly classified as negative. The established titre categories are based on n = 100 blood donors¹ (adult men and women between 18 to 70 years of age) and n = 277 pathological samples². Sera were assayed for each of the 3 gangliosides (GD1b, GQ1b and GM1), according to the assay procedure. Results of normal blood donors are shown in table 16.

Guidelines for the use of cut-off and titre categories / ratios (%):

Clinical Interpretation	Titre Category / Ratio (%)
Negative	<30
Grey zone	30-50
Cut-off	50
Positive	>50-100
Strongly positive	>100

Table 6

¹) Collected at the blood donation centre, University Hospital of Basel

²) Received from Friedrich-Baur-Institute, Ludwig-Maximilians-University of Munich; Department of Neurology, University of Basel; Department of Neurology, University of Lyon.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-assay precision (within-run):

GD1b: 2.3-4.4 % CV; GQ1b: 2.6-5.2 % CV;

GM1: 1.4-5.7 % CV.

For each of the three gangliosides coated on the microtiter plate of the BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA test two anti-ganglioside positive sera were selected. The serum samples were assayed in twelve replicates in a single run for each of the enzyme labels: IgG/IgM Mix, IgG and IgM. The study was performed with one reagent lot. The results are summarized in table 9, 10 and 11.

Inter-assay precision (between-run):

GD1b: 8.0-13.2 % CV; GQ1b: 8.2-19.6 % CV;

GM1: 9.0-21.0 % CV.

For each of the three gangliosides coated on the microtiter plate of the BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA test two anti-ganglioside positive sera were selected. The serum samples were assayed in single replicates in 20 independent runs, with one run per day, for each of the enzyme labels: IgG/IgM Mix, IgG and IgM. The study was performed with one reagent lot. The results are summarized in table 12, 13 and 14.

Limit of Blank (LoB): ≤6.1 % ratio

The LoB was established according to the CLSI guideline EP17-A. Twelve blank replicates (incubation buffer) per ganglioside were assayed in a single run for all three enzyme labels: IgG/IgM Mix, IgG and IgM. The Limit of Blank (LoB), expressed as the % ratio to the calibrator absorbance, was calculated to be 6.1 % for enzyme label IgG/ IgM Mix, ≤3.1 % for enzyme label IgG and ≤2.6 % for enzyme label IgM. The highest LoB obtained with the three different enzyme labels was taken to determine the overall Limit of Blank (LoB). The study was performed with one reagent lot. The LoB was evaluated by using parametric analysis.

Limit of Detection (LoD): ≤8.1 % ratio

The LoD was established according to the CLSI guideline EP17-A. For each of the three gangliosides coated on the microtiter plate a single clinical sample representing low antibody concentration was measured in twelve replicates, in a single run for each of the three enzyme labels: IgG/IgM Mix, IgG and IgM. The LoD, expressed as the % ratio to the calibrator absorbance, was calculated to be ≤8.1 % for enzyme label IgG/ IgM Mix, ≤6.3 % for enzyme label IgG, and ≤3.0 % for enzyme label IgM. The highest LoD obtained with the three different enzyme labels was taken to determine the overall Limit of Detection (LoD). The study was performed with one reagent lot. The LoD was calculated using parametric analysis.

Functional sensitivity: ≤8.1 % ratio

A precision profile was generated from the results obtained in the inter-assay precision study described above, for two positive sera samples for each of the three gangliosides coated on the microtiter plate and detected with each of the enzyme labels: IgG/IgM Mix, IgG and IgM. The data points were fitted using a polynomial non-linear fit with a cubic function.

The 95 %-confidence intervals of the fit were determined and the functional sensitivity was determined as the intersection of the cubic fit with the 20 % CV acceptance criterion. The results are summarized in figure 2.

Linearity

The linear range of the BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA was determined according to the CLSI guideline EP06-A. Multiple sera with concentrations over the entire measuring range of the test, allowing the evaluation of the majority of ganglioside / enzyme label combinations, were used. Serum samples were diluted according to the instruction for use. In case of high positive serum samples a higher dilution of 1:2000 was applied. Subsequently dilution series from each sample were prepared in graduations of 10 % using incubation buffer as the diluent. Linearity was defined as the interval in which the relative difference between the linear and, if significant, higher order polynomial fit was below 20 %. For ratios ≤25 % an absolute difference of below 5 % ratio was allowed. A linear range covering and exceeding the BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA titre categories of <30 % - negative; 30-50 % - grey-zone; 50-100 % positive and >100 % strongly positive was confirmed. The results are summarized in table 15.

INTERFERING SUBSTANCES

No interference is detected with the following substances up to the following concentrations: unconjugated bilirubin (icteric sera): 40 mg/d; conjugated bilirubin (icteric sera): 60 mg/dL; haemoglobin (haemolyzed sera): 400 mg/dL; haemolyzate (haemolyzed blood): 400 mg/dL and Triglycerides (Intralipid®): 3000 mg/dL.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zur Detektion von Antikörpern gegen definierte relevante neuronale Antigene GD1b, GQ1b und GM1 in Serumproben von Patienten mit Verdacht auf eine periphere Neuropathie mit unbekannter Ätiologie. Der Test ermöglicht eine quantitative Klassifizierung der Ergebnisse in Titerkategorien und dient als Hilfsmittel zur Diagnose von Neuropathien (Ref. 1-7).

ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN

Die drei verschiedenen Enzymmarker, die im Kit enthalten sind, erlauben drei Anwendungsmöglichkeiten:

1. Durch die Analyse mit dem Enzymmarker-IgG/IgM Mix wird die Anwesenheit von Antikörpern überprüft, um eine mögliche Autoimmun-Neuropathie anzuzeigen.
2. Durch die Analyse mit individuellen Enzymmarker-IgG und/oder -IgM wird die Anwesenheit von Isotyp-Antikörpern bestimmt.
3. Für die Laboraufarbeitung kann nach erster Probenuntersuchung mittels Enzymmarker-IgG/IgM Mix (Option 1) und nach vorheriger Beratung mit einem Kliniker / überweisenden Neurologen eine Differenzierung der Mix-positiven Proben mithilfe individuellen Enzymmarker-IgG und -IgM (Option 2) erfolgen.

PRINZIP DER METHODE

Der vorliegende BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA Test ist ein enzym-immunometrischer Festphasentest. Die Mikrotiterplatte ist streifenweise mit Gangliosiden GM1, GD1b und GQ1b beschichtet.

Kalibrator, Kontrollen und Serumproben werden in den Wells der Mikrotiterplatte inkubiert. Die potenziell vorhandenen anti-Gangliosid Antikörper binden an die immobilisierten Ganglioside. Durch Waschschriffe werden ungebundene Substanzen entfernt. Die mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierten Antikörper werden gegen menschliches IgG und/oder IgM nachgewiesen. Nach einem zweiten Waschschriff, bei dem der ungebundene Enzymmarker entfernt wird, wird eine Substratlösung, die Tetramethylbenzidin (TMB) enthält, zugegeben. Durch die Enzymreaktion entsteht eine Blaufärbung. Die Blaufärbung verhält sich proportional zur Menge an Antikörpern, die an die immobilisierten Ganglioside gebunden sind. Die Zugabe einer sauren Stopp-Lösung (verdünnte Schwefelsäure) beendet die Reaktion und bewirkt einen gelben Farbumschlag. Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung, ist proportional zum Titer der Antikörper in den Proben. Die Titer der Antikörper werden als %-Verhältnis (% Ratio) zum Kalibrator angegeben und kann zu den Titerkategorien zugeteilt werden (negativ, Grauzone, positiv, stark positiv).

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Mikrotiterplatte Beschichtet mit Gangliosiden	8 x 12 Wells	B-GCL-MP	Gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Stück		
Waschpufferkonzentrat (10x) Mit Konservierungsmitteln	1 Flasche 100 mL	B-GCO-WB	Mit 900 mL deionisiertem Wasser verdünnen
Inkubationspuffer Mit Konservierungsmitteln	1 Flasche 100 mL	B-GCO-IB	Gebrauchsfertig
Kalibrator lyophilisiert mit Konservierungsmitteln	1 Flasche	B-GCO-CA	Mit 1.5 mL Inkubationspuffer versetzen
Kontrollen negativ, tief und medium; lyophilisiert mit Konservierungsmitteln	3 Flaschen	B-GCO-CONSET	Mit 1.5 mL Inkubationspuffer versetzen
Enzymmarker-IgG Anti-human-IgG, gekoppelt mit HRP in einem Protein-basierten Puffer mit Konservierungsmitteln	1 Flasche 11 mL	B-GCO-ELG	Gebrauchsfertig
Enzymmarker-IgM Anti-human-IgM, gekoppelt mit HRP in einem Protein-basierten Puffer mit Konservierungsmitteln	1 Flasche 11 mL	B-GCO-ELM	Gebrauchsfertig
Enzymmarker-IgG/IgM Mix Anti-human-IgG und -IgM Ak, gekoppelt mit HRP in einem Protein-basierten Puffer mit Konservierungsmitteln	1 Flasche 11 mL	B-GCO-ELGM	Gebrauchsfertig
TMB-Substrat in Zitrat-gepufferter Lösung	1 Flasche 11 mL	B-TMB	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M Schwefelsäure	1 Flasche 11 mL	B-ST5	Gebrauchsfertig Korrosiv

Tabelle 1

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Zu verwenden bis zum Verfallsdatum angegeben auf der Packungsetikette. Lagerung bei 2-8 °C.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Mikrotiterplatte	Ungebrauchte Streifen sofort in die mit Trockenmittel versehene Aluminiumpackung zurückgeben. Packung vollständig verschliessen. Bis zu 4 Monate bei 2-8 °C haltbar.
Waschpuffer	Zu verwenden bis 4 Monate nach der Rekonstitution. Bei 2-8 °C lagern.
Kalibrator	Zu verwenden bis 4 Monate nach der Rekonstitution. Bei 2-8 °C lagern. Nicht einfrieren!
Kontrollen	
Inkubationspuffer	Zu verwenden bis zum Verfallsdatum. Bei 2-8 °C lagern.
Enzymmarker	
TMB-Substrat	
Stopp-Lösung	Zu verwenden bis zum Verfallsdatum. Bei 18-28 °C lagern.

Tabelle 2

NICHT IM KIT ENTHALTENE ERFORDERLICHE MATERIALIEN

- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen für 20 µL, 100 µL und 1000 µL
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Vorbereitung der Verdünnungsproben
- 1000 mL Zylinder zur Verdünnung des Waschpuffers
- Mikrotiterplatten-Waschautomat oder Spritzflasche für Waschpuffer
- Saugfähiges Papier
- Orbitaler Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm

VORSICHTSMASSAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

- Kalibrator (B-GCO-CA) und Kontrollen (B-GCO-CONSET) enthalten Bestandteile humanen Ursprungs. Obwohl sie in Tests für HBV Oberflächenantigen-, HCV- und HIV1/2-Antikörper negativ waren, sollten sie gemäss „Guter Laborpraxis“ als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- Stopp-Lösung: Die Stopp-Lösung (B-ST5) enthält Schwefelsäure (0,25 M). Das Reagenz reizt die Augen, Haut und Schleimhäute. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit viel Wasser spülen.
- Reagenzien: Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Im Falle eines Kontaktes sofort mit reichlich Wasser spülen, ansonsten kann eine Reizung oder Verätzungen auftreten.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss den gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

- Lesen Sie die Gebrauchsanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig durch. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden und wenn die Komponenten nicht entsprechend der in dieser Gebrauchsanleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Auf Grund des Produktionsprozesses können Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten auftreten. Sie werden mit dem 1. Waschschrift (Schritt 3) entfernt und haben keinen Einfluss auf die Ergebnisse.
- Die Reagenzien sind vor dem Start des Testverfahrens vorzubereiten. Die in den Schritten 3-9 verwendeten Reagenzien müssen gekühlt verwendet werden (2-8 °C) und während des Pipettierens und Waschens kühl gehalten werden. Bringen Sie das TMB-Substrat beim Teststart auf Raumtemperatur (18-28 °C).
- Schritt 3-9: In allen Schritten sollten auf 2-8 °C gekühlte Reagenzien verwendet werden und während des Pipettierens kühl gehalten werden. Empfehlung: Bereiten Sie den Waschpuffer am Abend vor der Testdurchführung vor und stellen Sie ihn über Nacht in den Kühlschrank.

- Waschschriffe (Schritte 3, 6 und 9): Die Waschschriffe sind entscheidend für die Entfernung von potenziellen Rückständen in den Wells der Mikrotiterplatten. Sie stammen aus allfälligen Rückständen aus dem Produktionsprozess; (Schritt 3) bzw. nicht gebundene Antikörper (Schritte 6 und 9).
→ Alle Waschschriffe sind mit kaltem Waschpuffer (2-8 °C) durchzuführen.
→ Alle Wells müssen jeweils nach dem letzten Waschzyklus vollständig entleert werden.
- Schritt 9: Das verwendete TMB-Substrat muss vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-28 °C) gebracht werden.
- Schritt 11: Während der Substratinkubation muss die Platte jeweils geschüttelt werden. Empfohlene Umdrehungen pro Minute: 400 bis 600. Die angegebenen Umdrehungen pro Minute (400-600) können nicht direkt auf jeden Schüttler übertragen werden. Die Lösung in den Wells soll in Bewegung gebracht werden, darf aber nicht überschwappen.
- Wird ein Waschautomat eingesetzt, soll der sogenannte „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass das Einfüllen des Waschpuffers erst über die gesamte Platte ausgeführt, bevor das Absaugen gestartet wird.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kit Lots.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu einer Kontamination zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und Wells kommt.
- Mikrotiterplatten-Streifen dürfen nicht wiederverwendet werden.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

- Der Ansatz benötigt <0,1 mL Blut oder <50 µL Serum.
- Interferenzen hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben wurden untersucht und sind im Kapitel „Interferierende Substanzen“ dargestellt.
- Blutproben in den entsprechenden Röhrchen sammeln (ohne Antikoagulanzen). Hämolyse vermeiden. Eine Stunde lang bei RT (18-28 °C) gerinnen lassen. 10 Minuten lang bei RT und ca. 1500 x g zentrifugieren und danach Serum abnehmen.
- Für die Probenlagerung empfehlen wir die Herstellung von Aliquots, um wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden.
- Lagerung von Serumproben bis zu 4 Monaten bei ≤-20 °C. Für längerfristige Lagerung empfehlen wir die Lagerung bei -70 °C (Probenstabilität >1 Jahr). Proben sollten vor dem Gebrauch aufgetaut und mit dem Vortexer gut gemischt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Sie können zwischen drei grundlegenden Optionen wählen:

- (1) Nachweis von IgG/IgM Mix-Isotypen: Schritt 4a bis 4e und 7
- (2) Nachweis von getrennten IgG und IgM Isotypen: Schritt 4a' bis 4f' und 7'
- (3) Ansatz in zwei Stufen: Option 1 → autoimmune Antikörper, positive Proben → Option 1

Hinweis: TMB-Substrat ist vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-28 °C) zu bringen.

1. Patientenproben mit Inkubationspuffer 1:50 verdünnen. Nehmen Sie 30 µL Serum + 1470 µL Inkubationspuffer, (gekühlt: 2-8 °C!). Mit dem Vortexer gut mischen und die verdünnten Proben, den rekonstituierten Kalibrator und die Kontrollen 30 Minuten lang bei 2-8 °C kühlen (siehe: Pipettierschritt 4a und b).

2. Eine Mikrotiterplatte mit ausreichend Streifen für das Testen der gewünschten Proben vorbereiten. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und sofort mit dem Trockenmittel verpacken und gekühlt lagern.

Wichtig: In den Schritten 3 bis 9 gekühlte (2-8 °C) Lösungen benutzen.

3. Wells zweimal mit jeweils ≥ 300 µL kaltem Waschpuffer waschen. Platte durch sorgfältiges Ausschlagen auf saugfähigem Papier trocknen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen.

Hinweis: Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt fort.

Option 1: Nachweis von IgG/IgM Mix-Isotypen:

- 4a. 100 µL Kalibrator in das Well A1 pipettieren (siehe Abbildung 1A).
- 4b. 100 µL Kontrolle „medium“ in das Well B1, 100 µL Kontrolle „tief“ in das Well A2 und 100 µL Kontrolle „negativ“ in das Well B2 pipettieren (siehe Abbildung 1A).

Hinweis: Falls mehr als drei Streifen pro Testlauf verwendet werden, können Kalibrator und Kontrollen als Doppelwert (siehe Abbildung 1A) getestet werden.

- 4c. 100 µL verdünnte Serumprobe 1 in das Well C1-E1 pipettieren (siehe Abbildung 1A).
- 4d. 100 µL verdünnte Serumprobe 2 in das Well F1-H1 pipettieren (siehe Abbildung 1A).
- 4e. 100 µL verdünnte Serumprobe 3 bis 24 in die nächsten Wells pipettieren (siehe Abbildung 1A).

Option 2: Nachweis von IgG-Isotypen:

- 4a'. 100 µL Kalibrator in das Well A1 pipettieren (siehe Abbildung 1B).
- 4b'. 100 µL Kontrolle „medium“ in das Well B1, 100 µL Kontrolle „tief“ in das Well A2 und 100 µL Kontrolle „negativ“ in das Well B2 pipettieren (siehe Abbildung 1B).

Hinweis: Falls mehr als drei Streifen pro Testlauf benutzt werden, können Kalibrator und Kontrollen als Doppelwert (siehe Abbildung 1B) getestet werden.

- 4c'. 100 µL verdünnte Serumprobe 1 in die Wells C1-E1 pipettieren (siehe Abbildung 1B).

4d'. 100 µL verdünnte Serumprobe 2 in die Wells F1-H1 pipettieren (siehe Abbildung 1B).

4e'. 100 µL verdünnte Serumproben 3-12 in die nächsten Wells pipettieren.

Nachweis von IgM-Isotypen:

4f' Die Schritte 4a'-4e' unter Verwendung der nachfolgenden Wells oder mit einer neuen Mikrotiterplatte wiederholen (siehe Abbildung 1B).

Option 1 und 2: Inkubation der Proben und Waschen

5. Mikrotiterplatte mit einer Abdeckfolie abdecken und während 2 Stunden ± 5 Minuten bei 2-8 °C inkubieren (Mikrotiterplatte nicht schütteln).
6. Abdeckfolie entfernen, die Wells entleeren und dreimal mit ≥ 300 µL kaltem Waschpuffer waschen. Platte auf saugfähigem Papier ausschlagen, um Waschpuffer vollständig zu entfernen.

Option 1: Nachweis von IgG/IgM Mix-Isotypen

7. 100 µL Enzymmarker-IgG/IgM Mix zu jedem Well geben.

Option 2: Nachweis von IgG- und IgM-Isotypen

- 7'. 100 µL Enzymmarker-IgG oder -IgM zu jedem Well geben (siehe Abbildung 1B).

Option 1 und 2: Inkubation mit Enzymmarker, Waschen und Nachweis

8. Mikrotiterplatte mit Folie abdecken und während 2 Stunden ± 5 Minuten bei 2-8 °C inkubieren. Diese Inkubation erfordert kein(!) Schütteln.
9. Folie entfernen, Wells entleeren und dreimal mit jeweils ≥ 300 µL kaltem (2-8 °C) Waschpuffer waschen. Platte auf saugfähigem Papier ausschlagen.

Wichtig: TMB-Substrat auf 18-28 °C bringen.

10. 100 µL TMB-Substrat zu jedem Well geben.
11. Mikrotiterplatte mit Folie abdecken und 30 \pm 2 Minuten bei 18-28 °C auf einem orbitalen Mikrotiterplatten-Schüttler bei 400-600 U/m inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.
12. 100 µL Stopp-Lösung zu jedem Well zugeben. Innerhalb von 30 Minuten mit Schritt 13 fortfahren.
13. Messen der optischen Dichte bei 450 nm.

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Gebrauchsanleitung ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und durch die Einhaltung der Anleitung erreicht.

Da es keine kommerziell erhältlichen Kontrollen für anti-Gangliosid-Antikörper gibt, wird empfohlen, positive und negative Serumproben als interne Qualitätskontrolle anzuwenden.

Für den Kalibrator wird ein Mindest-OD-Wert von 1,2 empfohlen. Alle Kontrollen müssen innerhalb der festgelegten erwarteten Bereiche liegen (% Ratio). Die erwarteten Bereiche der Kontrollen sind chargenspezifisch und auf dem QC-Datenblatt angegeben.

Falls die Leistungsmerkmale des Tests nicht in den angegebenen Bereichen liegen und Wiederholungsmessungen ein technisches Problem ausschließen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Wurden alle Reagenzien in Schritt 3-10 bei 2-8 °C verwendet? ii) Genauigkeit von Pipetten, Temperatur- und Zeitmessgeräten, iii) Einstellungen des Photometers und ELISA-Washer, iv) Verfallsdaten der Reagenzien, v) Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, vi) die TMB-Substratlösung sollte farblos sein, vii) Wasserreinheit.

STANDARDISIERUNG

Der Kalibrator in diesem Kit ist gegen eine interne Referenz kalibriert und wurde auf 100 % Ratio eingestellt.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Auswertung:

- Optische Dichte aller Wells (Kalibrator, Kontrollen und Patientenproben) bei 450 nm messen.
- Falls erforderlich Mittelwert aus den Doppelmessungen ermitteln.
- Resultate werden als Verhältnis der Absorption der gemessenen Probe und der Absorption des Kalibrators (Mittelwert) angegeben:

IgG/IgM Mix-Isotypen:

$$\% \text{ Ratio: } \frac{\text{Absorption der Proben oder Kontrollen}}{\text{Absorption des Kalibrators}} \times 200$$

IgG und IgM Isotypen:

$$\% \text{ Ratio: } \frac{\text{Absorption der Proben oder Kontrollen}}{\text{Absorption des Kalibrators}} \times 100$$

Ein Auswertungsprogramm zur Ermittlung der % Ratio ist auf den meisten Mikrotiterplatten-Lesegeräten vorhanden.

Hinweis: Tabellen 7 und 8 zeigen typische Messwerte für den BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA. Die Daten dienen nur als Beispiel. Die Absorptionswerte des Kalibrators und der Kontrollen müssen bei jeder Testdurchführung neu ermittelt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Es wird empfohlen, dass die Grauzonenergebnisse und die mit dem Enzymmarker-IgG/IgM Mix erhaltenen positiven Ergebnisse vor einer weiteren Isotypenbestimmung mit individuellen Enzymmarker-IgG und -IgM mit einem Kliniker / überweisenden Neurologen diskutiert werden,.
- Dominante Autoimmunantworten können Kreuzreaktivitäten mit anderen getesteten Gangliosiden zeigen. Die Kreuzreaktivität zeigt typischerweise eine hohe Inter-Assay Variation an und kann klinisch nicht relevant sein. Die Interpretation der Ergebnisse sollte daher nur zusammen mit einem Fachmann / Spezialisten erfolgen.

- Aufgrund der Polyreaktivität von Autoimmun-Antikörpern (Ref. 6) und aufgrund von Unterschieden in der geographischen Prävalenz, sollten Testergebnisse nur zur Unterstützung der klinischen Interpretation der Neuropathie durch einen Fachmann / Spezialisten in Kombination mit dem klinischen Bild des Patienten verwendet werden.
- Der BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA wurde nicht validiert für Plasmapherese-Proben.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Entsprechende Einschränkungen - falls zutreffend - sind durch hochgestellte Zahlen angegeben.

	Isotyp: IgG/IgM Mix		
Titerkategorien / Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativ	Siehe Einschränkungen ¹	Siehe Einschränkungen ¹
GQ1b			
GM1			

Tabelle 6

	Isotyp: IgG		
Titerkategorien / Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativ	Erneutes Prüfen zu einem späteren Zeitpunkt	Positiv
GQ1b			
GM1			

Tabelle 7

	Isotyp: IgM		
Titerkategorien / Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativ	Erneutes Prüfen zu einem späteren Zeitpunkt	Positiv
GQ1b			
GM1			

Tabelle 8

REFERENZINTERVALLE UND GRENZWERT

In Zusammenarbeit mit den unten aufgeführten Institutionen haben wir den klinischen Grenzwert auf 50 % gesetzt. Werte <30 % sind als sicher negativ einzustufen.

Die Werte wurden auf Grundlage einer Auswertung von n = 100 Blutspendern¹ (Männer und Frauen zwischen 18 und 70 Jahren) und n = 277 Proben von Patienten mit pathologischen Befunden^{2,3} ermittelt. Die Seren wurden auf jedes der 3 Gangliosid-Antikörper (GM1, GD1b und GQ1b) entsprechend der Arbeitsvorschrift analysiert. Die Resultate der Blutspender sind in Tabelle 16 dargestellt.

Richtwerte für die Beurteilung der Ergebnisse:

Klinische Interpretation	Titerkategorien / Ratio (%)
Negativ	<30
Grauzone	30-50
Grenzwert	50
Positiv	>50-100
Stark positiv	>100

Tabelle 6

¹⁾ Erhalten vom Blutspendezentrum der Universität Basel

²⁾ Erhalten vom Friedrich-Baur-Institut, der Ludwig-Maximilians-Universität München

³⁾ Neurologie der Universität Basel und von der Neurologischen Klinik, Universität Lyon.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay-Präzision (innerhalb eines Testlaufs):

GD1b: 2.3-4.4 % CV; GQ1b: 2.6-5.2 % CV;

GM1: 1.4-5.7 % CV.

Für jedes der drei auf der Mikrotiterplatte des BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA Tests beschichtet Ganglioside, wurden zwei anti-Gangliosid-positive Seren ausgewählt. Die Serumproben wurden in einem einzelnen Testlauf für jeden Enzymmarker (IgG/IgM Mix, IgG und IgM) in zwölf Replikaten geprüft. Der Wert der Intra-Assay-Präzision liegt für den Enzymmarker-IgG/IgM Mix im Bereich von 2,6 bis 4,5 % CV, für den Enzymmarker-IgG im Bereich von 2,5 bis 5,7 % CV und für den Enzymmarker-IgM im Bereich von 1,4 bis 5,2 % CV. Die Studie wurde mit einem Reagenzien-Lot durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 9, 10 und 11 zusammengestellt.

Inter-Assay-Präzision (zwischen Testläufen):

GD1b: 8.0-13.2 % CV; GQ1b: 8.2-19.6 % CV;

GM1: 9.0-21.0 % CV.

Für jedes der drei auf der Mikrotiterplatte des BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA Tests beschichtet Ganglioside, wurden zwei anti-Gangliosid-positive Seren ausgewählt. Die Serumproben wurden für jeden Enzymmarker (IgG/IgM Mix, IgG und IgM) in einzelnen Replikaten in 20 unabhängigen Testläufen - mit einem Testlauf pro Tag - geprüft. Der Wert der Inter-Assay-Präzision liegt für den Enzymmarker-IgG/IgM Mix im Bereich von 8,2 bis 15,2 % CV, für den Enzymmarker-IgG im Bereich von 11,6 bis 21,0 % CV und für den Enzymmarker-IgM im Bereich von 8,0 bis 15,6 % CV. Die Studie wurde mit einem Reagenzien-Lot durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 12, 13 und 14 zusammengestellt.

Limit of Blank (LoB): ≤6,1 % Ratio

Der LoB-Wert wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP17-A bestimmt. Zwölf Blank-Replikate (Inkubationspuffer) pro Gangliosid wurden in einem einzelnen Testlauf mit jedem der drei Enzymmarkern (IgG/IgM Mix, IgG und IgM) geprüft. Der Limit of Blank Wert (LoB), der als % Ratio zur Absorption des Kalibrators ausgedrückt wird, wurde für den Enzymmarker-IgG/IgM Mix; 6,1 %, für den Enzymmarker-IgG; ≤3,1 % und für den Enzymmarker-IgM; ≤2,6 % berechnet. Der höchste mit den drei unterschiedlichen Enzymmarker erhaltene LoB-Wert, wurde verwendet, um den gesamten LoB-Wert zu ermitteln. Die Studie wurde mit einer Reagenzien-Lot durchgeführt. Der LoB Wert wurde mithilfe einer parametrischen Analyse bewertet.

Limit of Detection (LoD): ≤8,1 % Ratio

Der LoD wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP17-A ermittelt. Für jedes der drei auf der Mikrotiterplatte beschichteten Gangliosiden (IgG/IgM Mix, IgG und IgM) wurde eine einzelne klinische Probe, die eine niedrige Antikörperkonzentration repräsentiert, in zwölf Replikaten in einem einzelnen Testlauf gemessen. Der LoD-Wert, der als % Ratio zur Absorption des Kalibrators ausgedrückt wird, wurde für den Enzymmarker-IgG/IgM Mix; ≤8,1 %, für den Enzymmarker-IgG; ≤6,3 % und für den Enzymmarker-IgM; ≤3,0 % berechnet. Der höchste mit den drei unterschiedlichen Enzymmarker erhaltene LoD-Wert, wurde verwendet, um den gesamten LoD-Wert zu ermitteln. Die Studie wurde mit einer Reagenzien-Lot durchgeführt. Der LoD wurde mithilfe einer parametrischen Analyse bewertet.

Funktionelle Sensitivität: ≤8.1 % Ratio

Ein Präzisionsprofil wurde von den Resultaten, die von der oben beschriebenen Inter-Assay Präzisionsstudie erhalten wurden, für zwei positive Serumproben für jedes der drei auf der Mikrotiterplatte beschichteten Gangliosiden generiert und wurde detektiert mit jedem der Enzymmarker: IgG/IgM Mix, IgG and IgM. Die Datenpunkte wurden mithilfe einer polynomialen, nicht-linearen Kurvenanpassung mit einer kubischen Funktion angepasst. Die 95 % Konfidenzintervalle der Kurvenanpassung wurde bestimmt und die funktionelle Sensitivität wurde bestimmt als die Schnittpunkte der kubischen Kurvenanpassung mit einem 20 % CV Akzeptanzkriterium. Die Resultate sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

Linearität

Der lineare Bereich des BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP06-A bestimmt. Mehrere Seren mit Konzentrationen über den gesamten Messbereich des Tests wurden verwendet. So konnte die Mehrzahl der Gangliosid / Enzymmarker-Kombinationen ermittelt werden. Die Serumproben wurden gemäss der Gebrauchsanweisung verdünnt. Bei stark positiven Serumproben wurde eine höhere Verdünnung von 1:2000 verwendet. Die anschliessende Verdünnungsreihe jeder Probe wurde mit Inkubationspuffer als Verdünnungsmittel in Verdünnungsstufen von 10 % hergestellt. Die Linearität wurde als das Intervall definiert, in dem die relative Differenz zwischen der linearen Anpassung und - falls signifikant - der polynominalen Anpassung einer höheren Ordnung unter 20 % lag. Bei % Ratios ≤ 25 % eine absolute Differenz von unter 5 % Ratio war erlaubt. Es wurde ein linearer Bereich bestätigt, der die BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA Titerkategorien von <30 % - negativ; 30-50 % - Grauzone; 50-100 % positiv und >100 % stark positiv abdeckt und darüber hinausgeht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 15 zusammengestellt.

INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Mit den folgenden Substanzen wurde bis zu den angegebenen Konzentrationen keine Interferenz nachgewiesen: unkonjugiertes Bilirubin (ikterische Seren): 40 mg/dL; konjugiertes Bilirubin (ikterische Seren): 60 mg/dL; Hämoglobin (hämolytierte Seren): 400 mg/dL; Hämolysat (hämolytiertes Blut): 400 mg/dL und Triglyzeride (Intralipid®): 3000 mg/dL.

DOMAINE D'UTILISATION

Le test de diagnostic *in vitro* BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA est conçu pour la détection d'anticorps dirigés contre des antigènes neuronaux définis GD1b, GQ1b et GM1, dans le sérum de patients pour lesquels une neuropathie périphérique d'étiologie inconnue est suspectée. Le test permet de quantifier les résultats sous forme de catégories de titres et apporte une aide au diagnostic des neuropathies (réf. 1-7).

APPLICATION PREVUE

En considérant les 3 marqueurs enzymatiques différents, les composants du coffret permettent trois options d'application :

1. Dépistage de la présence d'anticorps en utilisant le conjugué IgG/IgM Mix, permettant d'indiquer une potentielle neuropathie auto-immune.
2. Détermination de l'isotype de chaque anticorps en utilisant le conjugué IgG ou IgM.
3. Dans le but d'effectuer un bilan biologique, il est possible de réaliser un criblage initial de l'échantillon à l'aide du mélange de marqueurs enzymatiques « IgG/IgM » Mix (option 1), puis de le faire suivre par une différenciation isotypique des échantillons qui sont positifs au mélange (« Mix-positifs ») en utilisant les conjugués individuels IgG et IgM (option 2). Cette différenciation doit avoir lieu après consultation au préalable d'un clinicien/neurologue référent.

PRINCIPE DU DOSAGE

Le test de dosage BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA est basé sur une méthode immunométrique de type "sandwich".

Les puits des plaques incluses dans le coffret sont revêtus des gangliosides GM1, GD1b GQ1b.

Les échantillons sériques à tester ainsi que le calibrateur et les contrôles sont incubés dans la microplaque pendant deux heures. Les anticorps anti-gangliosides présents sont liés aux gangliosides revêtus sur la plaque.

Après l'élimination par lavage des composants non liés, des anticorps (Ac) dirigés contre les IgG ou IgM humaines et conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) sont ajoutés aux puits et la microplaque est incubée une nouvelle fois pendant deux heures. Après un second lavage, ayant pour but d'éliminer les anticorps marqués non liés, le substrat TMB (tétraméthylbenzidine) est ajouté, induisant une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-gangliosides initialement liés. La réaction de coloration est arrêtée par l'ajout d'une Solution Stop acide faisant passer la couleur du bleu au jaune. L'intensité de la coloration est déterminée par la mesure de l'absorption à 450 nm. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-gangliosides présents dans les échantillons. Les titres sont exprimés en % Ratio par rapport au calibrateur. Les catégories de résultats sont les suivantes : négatif, zone grise, positif, fortement positif. Les taux d'anticorps anti-gangliosides sont exprimés quantitativement à l'aide d'un % Ratio du calibrateur.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque Coatée (gangliosides)	12 x 8 puits	B-GCL-MP	Prête à l'emploi
Film adhésif	3 pièces		
Tampon de lavage, concentré (10x) avec agents de conservation	1 flacon 100 mL	B-GCO-WB	A reconstituer avec 900 mL d'eau déionisée
Tampon d'incubation avec agents de conservation	1 flacon 100 mL	B-GCO-IB	Prêt à l'emploi
Calibrateur lyophilisé et avec agents de conservation	1 flacon	B-GCO-CA	A reconstituer avec 1.5 mL de tampon d'incubation
Contrôles négatif, bas, moyen lyophilisés et avec agents de conservation	3 flacons	B-GCO-CONSET	A reconstituer avec 1.5 mL de tampon d'incubation
Marqueur enzymatique Ac anti-IgG humaines conjugués à HRP dans un tampon protéique avec agents de conservation	1 flacon 11 mL	B-GCO-ELG	Prêt à l'emploi
Marqueur enzymatique Ac anti-IgM humaines conjugués à HRP dans un tampon protéique avec agents de conservation	1 flacon 11 mL	B-GCO-ELM	Prêt à l'emploi
Marqueur enzymatique Ac anti-IgG et anti-IgM humaines conjugués à HRP dans un tampon protéique avec agents de conservation	1 flacon 11 mL	B-GCO-ELGM	Prêt à l'emploi
Substrat TMB TMB dans un tampon citrate	1 flacon 11 mL	B-TMB	Prêt à l'emploi
Solution Stop acide sulfurique 0.25 M	1 flacon 11 mL	B-ST5	Prête à l'emploi Corrosif

Tableau 1

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts / non entamés	
Stables à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.	
Réactifs ouverts / reconstitués	
Microplaque	Replacer immédiatement les barrettes non utilisées dans le sachet en aluminium contenant le dessiccateur puis le refermer soigneusement. Stable durant 4 mois à 2-8 °C.
Tampon de lavage	Stable durant 4 mois à 2-8 °C.
Calibrateur	Stables durant 4 mois à 2-8 °C.
Contrôles	Ne pas congeler !
Tampon d'incubation	Stables à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette
Marqueurs enzymatiques	
Substrat TMB	
Solution Stop	Stable à 18-28 °C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette

Tableau 2

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision de 20 µL, 100 µL et 1000 µL avec pointes jetables.
- Tubes en polystyrène ou polypropylène jetables, pour la préparation des dilutions.
- Eprouvette graduée de 1000 mL pour la préparation du tampon de lavage à partir de la solution concentrée.
- Laveur automatique de microplaques ou pissette pour le tampon de lavage.
- Papier absorbant.
- Agitateur orbital de microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

Précautions de sécurité

- Le calibrateur (B-GCO-CA) et les contrôles de cette trousse (B-GCO-CONSET) contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées.
- Solution Stop : La Solution Stop (B-ST5) contient de l'acide sulfurique (0,25 M). Le réactif est irritant pour les yeux, la peau et les muqueuses. Éviter le contact avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact avec les yeux ou la peau, laver immédiatement et abondamment à l'eau.
- Réactifs : Éviter le contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, laver immédiatement et abondamment à l'eau pour éviter tout risque d'irritation ou de brûlures.
- Pour en savoir plus sur les précautions concernant la manipulation et l'élimination des réactifs du kit, nous vous recommandons fortement de consulter l'organisme réglementaire compétent pour votre pays.

Précautions techniques

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Le test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte, de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- Les puits de la microplaque sont recouverts de cristaux de sel formés lors du processus de production. Ils sont éliminés par le lavage (voir l'étape 3 de la procédure) et n'ont aucune influence sur les résultats.
- Préparer les réactifs avant de démarrer la procédure de test. Les réactifs utilisés dans les étapes 3 à 9 doivent être froids (2-8 °C) et conservés au froid pendant le pipetage et les étapes de lavage. Le Substrat TMB doit être placé à température ambiante (18-28 °C).
- Étapes 3-9 : Utiliser des réactifs réfrigérés (2-8 °C) pour toutes ces étapes et les conserver réfrigérés durant le pipetage. Recommandation : Préparer le tampon de lavage le soir avant d'effectuer le dosage et le placer dans le réfrigérateur pendant la nuit.

- Étapes de lavage 3, 6 et 9 : les étapes de lavage sont cruciales et permettent d'ôter les résidus formés lors de la production (étape 3), et les anticorps non liés (étapes 6 et 9).
 - Toujours réaliser les étapes de lavage à froid (2-8 °C) avec du tampon de lavage
 - S'assurer que tous les puits sont complètement vides après le dernier cycle de lavage.
- Étape 9 : S'assurer d'utiliser du substrat TMB préalablement porté à température ambiante (18-28 °C).
- Étape 11 : Bien agiter la microplaque durant l'incubation avec le substrat. Selon l'agitateur utilisé, il est recommandé d'agiter entre 400 et 600 rpm. La solution doit s'agiter dans les puits mais sans déborder.
- Pour les laveurs automatiques, BÜHLMANN utilise le mode "plate mode", c'est à dire chaque étape du processus (distribution) est réalisée séquentiellement pour toutes les barrettes, avant de procéder à l'étape suivante du processus (aspiration).
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Il convient de prendre toutes les précautions requises pour empêcher toute contamination croisée entre réactifs, entre échantillons ou entre puits.
- Les puits sont à usage unique.

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

- La procédure requiert <0.1 mL de sang ou <50 µL de sérum.
- Se référer à la page 16 pour les informations sur les interférences avec les échantillons hémolytiques, lipémiques ou ictériques.
- Prélever le sang dans des tubes prévus à cet usage en évitant l'hémolyse, laisser coaguler à température ambiante (18-28 °C) pendant 1 heure, centrifuger à environ 1500 x g à température ambiante et recueillir le sérum.
- Nous recommandons d'aliquoter les échantillons des patients avant de les stocker afin d'éviter les cycles répétés de congélation/décongélation. Conserver les échantillons de sérum à ≤ -20 °C durant 4 mois. Nous recommandons de congeler les échantillons à -70 °C pour la conservation à long terme (>1 année).
- Les échantillons congelés doivent être décongelés et homogénéisés par agitation ou par inversion avant leur utilisation.

PROCEDURE DE DOSAGE

Il est possible de choisir entre les 3 options suivantes :

1. Détection des isotopes IgG/IgM Mix : étapes 4a à 4e et 7
2. Détection des isotopes IgG et IgM séparément : étapes 4a' à 4e' et 7'
3. Approche en 2 étapes : étape 1 → anticorps auto-immune, échantillons positifs → étape 2.

Note : Le Substrat TMB doit être équilibré à température ambiante.

1. Effectuer une dilution au 1:50 des échantillons de patient avec le tampon d'incubation (ex. 30 µL de sérum + 1470 µL de tampon d'incubation), à froid (2-8 °C). Mélanger vigoureusement (vortex) et laisser reposer les échantillons dilués, le calibrateur et les contrôles reconstitués 30 minutes à 2-8 °C (pour atteindre l'équilibre) avant de passer au pipetage de l'étape 4a et 4b.
2. Préparer une microplaque avec suffisamment de barrettes pour tester le nombre d'échantillons souhaités. Retirer les barrettes en trop du support et les remettre immédiatement au froid dans le sachet prévu à cet effet et contenant le dessiccateur.

Important : N'utiliser que des réactifs réfrigérés pour les étapes 3 à 9.

3. Laver chaque puits de la microplaque 2 fois avec ≥300 µL de tampon de lavage froid. Vider les puits et taper la microplaque sur du papier absorbant afin d'éliminer complètement le tampon de lavage.

Important : Continuer sans interruption avec l'étape suivante.

Option 1 : Détermination de l'isotype IgG/IgM Mix

- 4a. Distribuer 100 µL de calibrateur dans les puits A1 (voir figure 1A).
- 4b. Distribuer 100 µL de contrôle moyen dans les puits B1, 100 µL de contrôle bas dans les puits A2 et 100 µL de contrôle négatif dans les puits B2 (voir figure 1A).

Remarque : Si plus de trois barrettes sont utilisées par isotype, le calibrateur et les contrôles peuvent être testés en double (voir figure 1A).

- 4c. Distribuer 100 µL de sérum dilué du patient N° 1 dans les puits C1 à E1 (voir figure 1A).
- 4d. Distribuer 100 µL de sérum dilué du patient N° 2 dans les puits F1 à H1 (voir figure 1A).
- 4e. Distribuer 100 µL de sérum dilué du patient N° 3 à 24 dans les puits suivants (voir figure 1A).

Option 2 : Détermination de l'isotype IgG

- 4a'. Distribuer 100 µL de calibrateur dans les puits A1 (voir figure 1B).
- 4b'. Distribuer 100 µL de contrôle moyen dans les puits B1, 100 µL de contrôle bas dans les puits A2 et 100 µL de contrôle négatif dans les puits B2 (voir figure 1B).

Remarque : Si plus de trois barrettes sont utilisées par isotype, le calibrateur et les contrôles peuvent être testés en double dans les rangées A et B (voir figure 1B).

4c'. Distribuer 100 µL de sérum dilué du patient N° 1 dans les puits C1 à E1 (voir figure 1B).

4d'. Distribuer 100 µL de sérum dilué du patient N° 2 dans les puits F1 à H1 (voir figure 1B).

4e'. Distribuer 100 µL de sérum dilué du patient N° 3 à 12 dans les puits suivants (voir figure 1B).

Détermination de l'isotype IgM

4f'. Répéter les étapes 4a-e en utilisant les barrettes suivantes ou prendre une nouvelle microplaque si cela est nécessaire (voir figure 1B).

Pour les options 1 et 2 : incubation de l'échantillon et lavages

5. Couvrir la microplaque à l'aide du film adhésif fourni et incuber à 2-8 °C pendant 2 heures ± 5 minutes. Ne pas agiter la microplaque.
6. Retirer le film adhésif. Vider puis laver 3 fois chaque puits avec ≥300 µL de tampon de lavage réfrigéré (2-8 °C). Vider les puits et les sécher en tapant la microplaque sur du papier absorbant afin d'éliminer complètement le tampon de lavage.

Pour l'option 1 : Détermination de l'isotype IgG/IgM Mix

7. Ajouter 100 µL de marqueur enzymatique IgG/IgM Mix dans chaque puits.

Pour l'option 2 : Détermination des isotopes IgG et IgM

- 7'. Ajouter 100 µL de marqueur enzymatique IgG ou IgM dans les puits respectifs (voir figure 1B).

Pour les options 1 et 2 : Incubation avec le marqueur enzymatique, lavages et détection

8. Recouvrir la microplaque à l'aide d'un nouveau film adhésif et incubé à 2-8 °C pendant 2 heures ± 5 minutes. Ne pas agiter la microplaque.
9. Retirer le film adhésif. Vider puis laver 3 fois chaque puits avec ≥300 µL de tampon de lavage froid (2-8 °C). Vider les puits et les sécher en tapant la microplaque sur du papier absorbant.

Important : Laisser le Substrat TMB atteindre une température de 18-28 °C.

10. Ajouter 100 µL de Substrat TMB dans chaque puits.
11. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif puis l'incuber sur un agitateur de plaque orbital à 400-600 rpm à 18-28 °C durant 30 ± 2 minutes. Protéger la microplaque de la lumière directe.
12. Ajouter 100 µL de Solution Stop dans chaque puits en éliminant les bulles d'air à l'aide de pointes de pipettes. Passer à l'étape 13 dans les 30 minutes suivantes.
13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

CONTROLE QUALITE

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail de laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant les recommandations de cette brochure.

Comme il n'existe pas de sérum de référence pour les anticorps anti-ganglioside commercialement disponible, nous recommandons l'utilisation d'un pool de sérums positifs comme référence de contrôle de qualité interne.

Il est souhaitable que le calibrateur présente une valeur de DO au moins égale à 1,2. Tous les contrôles doivent présenter une valeur comprise dans les plages de mesures établies et attendues (ratio en %). Les plages attendues des contrôles sont propres au lot et indiquées dans la fiche de contrôle qualité.

Les caractéristiques de performance devraient être comprises entre les limites d'acceptabilité propres à chaque laboratoire. Si les caractéristiques ne correspondent pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) Avez-vous utilisé des réactifs réfrigérés (2-8 °C) pour les étapes 3 à 10 ? ii) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, iii) calibrage des instruments, iv) date de péremption des réactifs, v) conditions de stockage et d'incubation, vi) la solution de substrat TMB devrait être incolore, vii) pureté de l'eau.

STANDARDISATION

Le calibrateur de la trousse a été calibré à l'aide d'une référence interne qui a été ajustée à 100 %.

RESULTATS ET CALCULS

Calcul des résultats

- Mesurer l'absorbance (DO) à 450 nm de chaque puits (calibrateur, contrôles et échantillons de patient).
- Calculer la moyenne des duplicatas (si les mesures sont réalisées en duplicata).
- Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'absorbance de l'échantillon et contrôles par rapport à l'absorbance moyenne du calibrateur.

Isotypes IgG/IgM Mix

$$\% \text{ Ratio} : \frac{\text{absorbance des échantillons ou des contrôles}}{\text{absorbance du calibrateur}} \times 200$$

Isotypes IgG et IgM

$$\% \text{ Ratio} : \frac{\text{absorbance des échantillons ou des contrôles}}{\text{absorbance du calibrateur}} \times 100$$

La programmation de cette formule est réalisable sur la plupart des lecteurs de microplaque.

Remarque : Pour un exemple de résultats, voir tableaux 7 et 8. Ces résultats sont donnés à titre d'exemple uniquement. Les valeurs d'absorbance du calibrateur et des contrôles doivent être déterminées pour chaque série d'échantillons mesurée.

LIMITES

- Il est recommandé que les résultats obtenus dans la zone grise et les résultats positifs obtenus à l'aide du mélange de marqueurs enzymatiques « IgG/IgM » Mix fassent l'objet d'une discussion préalable avec un clinicien/neurologue de référence avant qu'une détermination isotypique à l'aide des marqueurs enzymatiques individuels IgG et IgM soit réalisée.
- Les réponses auto-immunes dominantes peuvent être accompagnées par une réactivité croisée avec d'autres gangliosides testés. La réactivité croisée présente typiquement une variation inter-essai élevée et peut être cliniquement non pertinente. L'interprétation des résultats doit donc impérativement être réalisée en présence d'un expert ou d'un spécialiste.
- Du fait de la polyréactivité des anticorps auto-immuns (réf 6) et des différences de prévalence géographique, les résultats des dosages doivent uniquement être utilisés pour aider à l'interprétation clinique de la neuropathie par un expert ou un spécialiste en lien avec le tableau clinique du patient.
- Le test BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA n'a pas été validé pour les échantillons issus de plasmaphérèse.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les éventuelles limites correspondantes sont indiquées par des chiffres en exposant.

	Isotype: IgG/IgM Mix		
Catégorie de titres / Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Négatif	Voir Limites, point ¹	Voir Limites, point ¹
GQ1b			
GM1			

Tableau 9

	Isotype: IgG		
Catégorie de titres / Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Négatif	Re-tester dans quelques mois	Positif
GQ1b			
GM1			

Tableau 10

	Isotype: IgM		
Catégorie de titres / Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Négatif	Re-tester dans quelques mois	Positif
GQ1b			
GM1			

Tableau 11

INTERVALLES DES REFERENCES ET RATIOS SEUILS

En accord avec les institutions mentionnées ci-dessous, nous avons établi un «cut off» (valeur seuil) clinique de 50 %. Les valeurs inférieures à 30 % doivent clairement être considérées comme négatives. Les valeurs des ratios ont été obtenues à partir des résultats de n = 100 échantillons de donneurs de sang normaux asymptomatiques (adultes de sexe masculin et féminin, âges compris entre 18 et 70 ans)¹⁾ et n = 277 échantillons pathologiques²⁾. Les sérums ont été testés pour chacun des 3 gangliosides (GM1, GD1b et GQ1b), conformément à la procédure d'utilisation du test. Les résultats des donneurs de sang sont présentés dans le tableau 16.

Guide d'interprétation des résultats :

Interprétation clinique	Catégorie de titres/Ratio (%)
Négatif	< 30
Zone grise	30-50
Seuil	50
Positif	> 50-100
Fortement positif	> 100

Tableau 6

¹⁾ Recueillis au centre de dons du sang, Hôpital Universitaire de Bâle.

²⁾ Fournis par l'Institut Friedrich Baur de l'Université Ludwig-Maximilian de Munich, le Département de Neurologie de l'Université de Bâle et le Département Neurologique de l'Université de Lyon.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision intra-essai (au cours du même dosage) :

GD1b : 2.3-4.4 % CV ; GQ1b : 2.6-5.2 % CV ;

GM1 : 1.4-5.7 % CV.

Pour chacun des trois gangliosides revêtus sur la microplaque, deux sérums positifs aux anti-gangliosides ont été sélectionnés. Les échantillons de sérum ont été analysés en douze répliqués en un seul dosage pour chacun des marqueurs enzymatiques : « IgG/IgM » Mix, IgG et IgM. La précision intra-dosage a été déterminée comme étant incluse dans l'intervalle allant de 2,6 à 4,5 % CV pour le marqueur enzymatique Mix IgG/IgM, de 2,5 à 5,7 % CV pour le marqueur enzymatique IgG et de 1,4 à 5,2 % CV pour le marqueur enzymatique IgM. L'étude a été mise en œuvre avec un seul lot de réactifs. Les résultats sont résumés dans les tableaux 9, 10 et 11.

Précision inter-essais (différents dosages) :

GD1b : 8.0-13.2 % CV ; GQ1b : 8.2-19.6 % CV ;

GM1 : 9.0-21.0 % CV.

Pour chacun des trois gangliosides revêtus sur la microplaque, deux sérums positifs aux anti-gangliosides ont été sélectionnés. Les échantillons de sérum ont été analysés en un seul répliquat dans 20 dosages indépendants, avec une analyse par jour, pour chacun des marqueurs enzymatiques : « IgG/IgM Mix », IgG et IgM. La précision inter-essai a été déterminée comme étant incluse dans l'intervalle allant de 8,2 à 15,2 % CV pour le marqueur enzymatique « IgG/IgM » Mix, de 11,6 à 21,0 % CV pour le marqueur enzymatique IgG et de 8,0 à 15,6 % CV pour le marqueur enzymatique IgM.

L'étude a été mise en œuvre avec un seul lot de réactifs. Les résultats sont résumés dans les tableaux 12, 13 et 14.

Limite de blanc (LoB) : ≤ 6,1 % ratio

La LoB a été établie selon la ligne directrice EP17-A du CLSI. Douze répliqués de blanc (tampon d'incubation) par ganglioside ont été analysés en un seul dosage pour chacun des marqueurs enzymatiques : « IgG/IgM » Mix, IgG et IgM. La limite de blanc (LoB), exprimée sous forme du ratio en % par rapport à l'absorbance du calibrateur, a été calculée comme étant ≤ 6,1 % pour le marqueur enzymatique « IgG/IgM » Mix, ≤ 3,1 % pour le marqueur enzymatique IgG et ≤ 2,6 % pour le marqueur enzymatique IgM. La LoB la plus élevée obtenue avec les trois marqueurs enzymatiques différents a été retenue pour déterminer la limite de blanc (LoB) globale. L'étude a été mise en œuvre avec un seul lot de réactifs. La LoB a été calculée par analyse statistique paramétrique.

Limite de détection (LoD) : ≤ 8,1 % ratio

La LoD a été établie selon la ligne directrice EP17-A du CLSI. Pour chacun des trois gangliosides revêtus sur la microplaque, un seul échantillon clinique présentant une faible concentration d'anticorps a été mesuré en douze répliqués, en un seul dosage pour chacun des trois marqueurs enzymatiques : « IgG/IgM » Mix, IgG et IgM. La limite de détection (LoD), exprimée sous forme du ratio en % par rapport à l'absorbance du calibrateur, a été calculée comme étant ≤ 8,1 % pour le marqueur enzymatique « IgG/IgM » Mix, ≤ 6,3 % pour le marqueur enzymatique IgG, et ≤ 3,0 % pour le marqueur enzymatique IgM. La LoD la plus élevée obtenue avec les trois marqueurs enzymatiques différents a été retenue pour déterminer la limite de détection (LoD) globale. L'étude a été mise en œuvre avec un seul lot de réactifs. La LoD a été calculée par analyse statistique paramétrique.

Sensibilité fonctionnelle : ≤ 8,1 % ratio

Un profil de précision a été généré à partir des résultats obtenus dans l'étude de précision inter-essais décrite ci-dessus, pour deux échantillons de sérum positifs pour chacun des trois gangliosides revêtus sur la plaque de microtitration et détectés avec chacun des marqueurs enzymatiques : « IgG/IgM » Mix, IgG et IgM. Les points de données ont été ajustés en utilisant un ajustement polynomial non linéaire avec une fonction cubique. Les intervalles de confiance à 95 % de l'ajustement ont été déterminés et la sensibilité fonctionnelle a été déterminée sous forme de l'intersection de l'ajustement cubique avec le critère d'acceptation de 20 % CV. Les résultats sont résumés sur la figure 2.

Linéarité

L'intervalle linéaire du test BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA a été déterminé selon la ligne directrice EP06-A du CLSI. De nombreux échantillons de sérum dont les concentrations couvraient l'ensemble de l'intervalle de mesure du test ont été utilisés, de manière à permettre l'évaluation de la plupart des combinaisons ganglioside/marqueur enzymatique. Les échantillons sériques ont été dilués selon les instructions d'utilisation. En cas d'échantillons de sérum fortement positifs, une dilution supérieure de 1:2000 a été appliquée. Les séries de dilution consécutives de chaque échantillon ont ensuite été préparées par paliers de 10 % en utilisant le tampon d'incubation comme diluant. La linéarité est définie comme étant l'intervalle sur lequel la différence relative entre l'ajustement linéaire et, lorsqu'il est significatif, l'ajustement polynomial d'ordre supérieur, est inférieure à 20 %. Pour les rapports ≤ 25 %, une différence absolue de moins de 5 % est autorisée. Un intervalle linéaire couvrant et dépassant les catégories de titres du test BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA, à savoir < 30 % (négatif), 30-50 % (zone grise), 50-100 % (positif) et > 100 % (fortement positif) a été confirmé. Les résultats sont résumés dans le tableau 15.

INTERFÉRENCES

Aucune interférence n'est détectée avec les substances suivantes à la concentration indiquée : bilirubine non conjuguée (sérum ictériques) : 40 mg/dL ; bilirubine conjuguée (sérum ictériques) : 60 mg/dL ; hémoglobine (sérum hémolysés) : 400 mg/dL ; hémolysat (sang hémolysé) : 400 mg/dL et triglycérides (Intralipid®) : 3000 mg/dL.

USO PREVISTO

Il BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA, è un test diagnostico *in vitro* per il rilevamento di anticorpi contro determinati antigeni neurali rilevanti GM1, GD1b e GQ1b (IgG and IgM) in campioni di siero di pazienti con sospetta neuropatie periferiche con una eziologia sconosciuta. Il test consente la classificazione quantitativa dei risultati in categorie titre e serve come supporto per la diagnosi delle neuropatie (rif. 1-7).

APPLICAZIONE PREVISTA

In relazione ai 3 diversi enzimi di coniugazione, i componenti del dispositivo consentono tre possibili applicazioni:

1. Test con il coniugato IgG/IgM mix permette di evidenziare la presenza di anticorpi e indicare un possibile neuropatia auto-immune.
2. Test con singoli IgG e/o IgM coniugati per la determinazione degli anticorpi isotipo.
3. In un work up di laboratorio, lo screening iniziale dei campioni con una mix di marcatori enzimatici IgG/IgM (opzione 1) può essere seguito da differenziazione di campioni mix-positivi usando coniugati individuali IgG e IgM (opzione 2), previa consultazione di un medico/neurologo di riferimento.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA si basa sulla tecnica dosaggio enzimatico immunometrico. I pozzetti della micropiastra fornito sono pre-coattati con gangliosidi: GM1, GD1b e GQ1b.

Il calibratore, i controlli ed i sieri dei pazienti vengono incubati nei pozzetti della micropiastra e gli anti-ganglioside (Ab) presenti vengono legati dai gangliosidi immobilizzati. Dopo il lavaggio delle sostanze non legate, gli anticorpi vengono rilevati con anticorpi perossidasi del rafano (HRP) contro IgG e/o IgM. A seguito di un secondo lavaggio per eliminare il reagente anticorpo-enzima non legato, viene aggiunta una soluzione di substrato contenente tetrametilbenzidina (TMB) ai pozzetti. Si sviluppa una colorazione blu in proporzione al quantitativo di anticorpi antiganglioside legati nello step iniziale. Lo sviluppo della colorazione viene bloccato aggiungendo una soluzione bloccante a base di acido che trasforma la colorazione blu in gialla. L'intensità dell'assorbanza del colore è misurata a 450 nm.

L'assorbanza misurata è proporzionale al titre di anticorpi presenti in un dato campione. I titre di anticorpi sono espressi come rapporto percentuale (%) di calibratore e possono essere assegnate delle categorie titre (negativo, zona grigia, positivo, fortemente positivo).

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropiastra Precoattata con gangliosidi	12 x 8- pozzetti	B-GCL-MP	Pronta all'uso
Foglio per sigillare la piastra	3 fogli		
Tampone di lavaggio concentrato (10x) Con conservanti	1 fialone 100 mL	B-GCO-WB	Diluire con 900 mL di acqua deionizzata
Tampone di incubazione Con conservanti	1 fialone 100 mL	B-GCO-IB	Pronto all'uso
Calibratore Liofilo con conservanti	1 fialone	B-GCO-CA	Aggiungere 1.5 mL di tampone di incubazione
Controllo negativo, basso ed medio; Liofilizzato con conservanti	3 fialoni	B-GCO-CONSET	Aggiungere 1.5 mL di tampone di incubazione
Marcatore enzimatico IgG Anticorpi Anti- IgG umane coniugati con HRP in un tampone a base proteica con conservanti	1 fialone 11 mL	B-GCO-ELG	Pronto all'uso
Marcatore enzimatico IgM Anticorpi Anti- IgM umane coniugati con HRP in un tampone a base proteica con conservanti	1 fialone 11 mL	B-GCO-ELM	Pronto all'uso
Marcatore enzimatico Mix Anticorpi Anti- IgG ed IgM umane coniugati con HRP in un tampone a base proteica con conservanti	1 fialone 11 mL	B-GCO-ELGM	Pronto all'uso
Substrato di TMB in tampone citrato	1 fialone 11 mL	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione bloccante 0.25 M di acido solforico	1 fialone 11 mL	B-ST5	Pronto all'uso Agente corrosivo

Tabella 1

CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Reagenti sigillati / non aperti	
Tutti i componenti del kit non utilizzati sono stabili a 2-8 °C fino alla data di scadenza stampata sulle etichette.	
Reagenti Aperti / Ricostituiti	
Micropiastra	Riporre immediatamente le strip non ancora utilizzate nella busta di alluminio che contiene essiccante e risigillarle. Conservare fino a 4 mesi a 2-8 °C.
Tampone di lavaggio	Conservare fino a 4 mesi a 2-8 °C.
Calibratore	Conservare fino ad 4 mesi a 2-8 °C.
Controlli	Non congelare!
Tampone di incubazione	Conservare a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sulle etichette.
Marcatore enzimatico	
Substrato di TMB	
Soluzione bloccante	Conservare a 18-28 °C fino alla data di scadenza indicata sulla etichetta.

Tabella 2

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso: 20 µL, 100 µL e 1000 µL
- Provette di polistirene o polipropilene monouso per la preparazione di diluizioni del campione
- Cilindro da 1000 mL per la ricostituzione del tampone di lavaggio
- Dispositivo manuale o automatico per il lavaggio/aspirazione della micropiastra
- Carta blottante
- Agitatore orbitale per micropiastra
- Lettore per micropiastra per le misurazioni dell'assorbanza a 450 nm

PRECAUZIONI

Precauzioni di sicurezza

- Il calibratore (B-GCO-CA) ed i controlli di questo kit (B-GCO-CONSET) contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio utilizzando le dovute precauzioni.
- Soluzione bloccante: La soluzione bloccante (B-ST5) contiene acido solforico (0,25 M). Questo reagente è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con gli occhi, pelle e vestiario. In caso di contatto con gli occhi o la pelle lavarsi immediatamente con abbondante acqua.
- Reagenti: Evitare il contatto dei reagenti con la pelle, occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua; altrimenti potrebbe verificarsi irritazione / bruciori.
- Le soluzioni non utilizzate devono essere smaltite secondo le normative statali e locali del proprio paese.

Precauzioni tecniche

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso
- Residui rimasti nei pozzetti sono causati dal processo di produzione. Questi residui vengono completamente eliminati dai lavaggi durante la procedura descritta e non compromettono in alcun modo i risultati (fare riferimento al punto 3 delle istruzioni per l'uso).
- Preparare i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. I reagenti usati nei punti 3-9 devono essere refrigerati (2-8 °C) e mantenuti refrigerati durante la dispensazione e il lavaggio. Equilibrare il TMB a temperatura ambiente (18-28 °C).
- Punto 3-9: Utilizzare e mantenere i reagenti refrigerati (2-8 °C) durante la dispensazione. Raccomandazione: Preparare il tampone di lavaggio la sera prima di eseguire il test e posizionarlo in frigorifero per tutta la notte.

- Processo di lavaggio per i punti 3, 6 e 9: Le fasi di lavaggio sono fondamentali per la rimozione di residui dei pozzetti della micropiastra derivanti dal processo di produzione (punto 3) nonché le eventuali anticorpi non legati (punti 6 e 9).
 - Eseguire sempre le fasi di lavaggio con il tampone di lavaggio freddo (2-8 °C).
 - Assicurarsi che tutti i pozzetti siano completamente vuoti dopo l'ultimo ciclo di lavaggio.
- Punto 9: Assicurarsi prima dell'uso che il substrato TMB raggiunga 18-28°C.
- Punto 11: Assicurarsi una buona agitazione della micropiastra durante l'incubazione con il Substrato TMB. A seconda del tipo di agitatore è consigliata una velocità di 400-600 rpm orbitali. La micropiastra deve essere agitata efficacemente, ma facendo in modo di evitare la fuoriuscita di liquido.
- Usando dispositivi automatici per lavaggio/ aspirazione della micropiastra, BÜHLMANN consiglia l'utilizzo della modalità: "plate mode"; dispensazione sequenziale in tutte le strip e successiva aspirazione.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Fare ogni tentativo per assicurarsi che tra i reagenti, i campioni o tra i pozzetti non vi siano contaminazioni incrociate.
- I micropozzetti non possono essere riutilizzati.

PRELIEVO DEI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

- La procedura richiede <0.1 mL di sangue o <50 µL di siero, rispettivamente.
- Per quanto riguarda le interferenze di campioni emolizzati, lipemici o itterici, fare riferimento a pagina 21.
- Prelevare il sangue in provette secche (senza anticoagulante), evitare l'emolisi, lasciare coagulare per un'ora, centrifugare per 10 minuti a circa 1500 x g a temperatura ambiente (18-28 °C), raccogliere il siero.
- BÜHLMANN raccomanda di aliquotare i campioni per evitare ripetuti cicli di congelamento / scongelamento.
- I campioni tenuti a ≤-20 °C sono stabili fino ad 4 mesi. Per periodi di conservazione più lunghi, (più di un anno) tenere i campioni a -70 °C.
- I campioni congelati devono essere scongelati completamente, quindi vortexati prima dell'utilizzo.

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

Si può scegliere fra tre opzioni di base:

- (1) Individuazione di IgG / IgM mix-isotipi: punto 4a-4e e 7
- (2) Individuazione di IgG e IgM isotipi: punto 4a'-4f' e 7
- (3) Approccio a due fasi: Opzione 1 → anticorpi autoimmuni, campioni positivi → Opzione 2.

Importante: Equilibrare il TMB a temperatura ambiente (18-28 °C)

1. Diluire tutti i campioni 1:50 con il tampone d'incubazione. Usare ad es: 30 µL di siero + 1470 µL di tampone di incubazione (freddo 2-8 °C). Mescolare bene vortexando e lasciare i campioni, il calibratore e i controlli a stabilizzarsi per 30 minuti a 2-8 °C prima di passare alla dispensazione secondo il punto 4a e 4b.
2. Preparare una piastra con strip a sufficienza per effettuare il numero di test necessari. Estrarre le strip in eccedenza dal supporto e risigillarle immediatamente nella busta insieme all'essiccante. Conservare refrigerato.

Importante: Utilizzare reagenti refrigerati dal punto 3 al punto 9.

3. Lavare due volte i pozzetti coattati utilizzando almeno 300 µL di tampone di lavaggio refrigerato per pozzetto. Svotare i pozzetti e blottare la piastra su carta assorbente assicurandosi che i pozzetti siano completamente vuoti.

Importante: Procedere immediatamente con i punti successivi.

Opzione 1: Individuazione di IgG/IgM mix-isotipi:

4a. Calibratore: Dispensare 100 µL di calibratore nel pozzetto A1 (vedi figura 1A).

4b. Controlli: Dispensare 100 µL di controllo medio nel pozzetto B1, Controllo basso nel pozzetto A2 e controllo negativo nel pozzetto B2 (vedi figura 1A).

Importante: Se vengono usate più di tre strip per seduta, dispensare calibratore e controlli in duplicato nei rimanenti pozzetti (vedi Figure A).

4c. Siero del paziente: Pipettare 100 µL di siero del paziente 1 diluito nei pozzetti C1-E1 (vedi figura 1A).

4d. Siero del paziente: Pipettare 100 µL di siero del paziente 2 diluito nei pozzetti F1-H1 (vedi figura 1A).

4e. Siero del paziente: Pipettare 100 µL di siero del paziente 3 a 24 diluito nei prossimi pozzetti (vedi figura 1A).

Opzione 2: Individuazione di IgG isotipi

4a'. Calibratore: Dispensare 100 µL di calibratore nel pozzetto A1 (vedi figura 1B).

4b'. Controlli: Dispensare 100 µL di controllo medio nel pozzetto B1, Controllo basso nel pozzetto A2 e controllo negativo nel pozzetto B2 (vedi figura 1B).

Importante: Se vengono usate più di tre strip per seduta, dispensare calibratore e controlli in duplicato nei rimanenti pozzetti (vedi figura 1B).

4c'. Siero del paziente: Pipettare 100 µL di siero del paziente 1 diluito nei pozzetti C1-E1 (vedi figura 1B).

4d'. Siero del paziente: Pipettare 100 µL di siero del paziente 2 diluito nei pozzetti F1-H1 (vedi figura 1B).

4e'. Siero del paziente: Pipettare 100 µL di siero del paziente 3 a 12 diluito nei prossimi pozzetti.

Individuazione di IgM isotipi

4f'. Ripetere i passaggi 4a'-4e' utilizzando i pozzetti successivi o una nuova micropiastra se necessario (vedi figura 1B).

Per le opzioni 1 e 2: Incubazione e lavaggio del campione

5. Coprire la piastra con il foglio protettivo ed incubare per 2 ore ± 5 minuti a 2-8 °C (non occorre utilizzare agitatore per micropiastra).
6. Togliere il foglio protettivo. Svotare i pozzetti e lavarli tre volte utilizzando almeno 300 µL di tampone di lavaggio refrigerato (2-8 °C) per pozzetto. Svotare i pozzetti e blottarli su carta assorbente.

Per l'opzione 1: Individuazione di IgG/IgM mix isotipi

7. Aggiungere 100 µL di marcatore enzimatico IgG/IgM mix nei pozzetti.

Per l'opzione 2: Individuazione di IgG e IgM isotipi

7'. Aggiungere 100 µL di marcatore enzimatico IgG o IgM nei pozzetti (vedi figura 1B).

Per le opzioni 1 e 2 Incubazione con marcatore enzimatici, lavaggio, individuazione

8. Coprire la piastra con un foglio protettivo e incubare per 2 ore ± 5 minuti a 2-8 °C (non agitare la piastra).

9. Rimuovere il foglio protettivo. Svotare i pozzetti e lavare tre volte utilizzando almeno 300 µL di tampone di lavaggio refrigerato (2-8 °C) per pozzetto. Svotare i pozzetti e colpire la piastra energicamente su carta assorbente.

Importante: Lasciare che il Substrato TMB raggiunga 18-28 °C.

10. Aggiungere 100 µL del substrato TMB ad ogni pozzetto.

11. Sigillare la piastra con un foglio protettivo, collocare la piastra su un mixer orbitale settato a 400-600 rpm, proteggere la piastra dalla luce diretta ed incubare per 30 ± 2 minuti a 18-28 °C.

12. Aggiungere 100 µL di soluzione bloccante ai pozzetti. Procedere al punto 13. entro 30 minuti.

13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastra.

CONTROLLO DI QUALITA'

La piena comprensione di questa metodica è necessaria per un uso ottimale del prodotto. Risultati affidabili potranno essere ottenuti solo utilizzando tecniche di laboratorio precise (odierne linee guida GLP) e seguendo accuratamente le istruzioni contenute in questa metodica. Poiché non vi è nessun siero di controllo per gli anticorpi antigangliosidi, disponibili in commercio, raccomandiamo l'utilizzo di un pool di siero positivo per i controlli di qualità interni.

Per il calibratore si raccomanda un valore OD minimo di 1.2. Tutti i controlli devono rientrare negli intervalli previsti (% rapporto). Gli intervalli previsti dei controlli sono specifici di ciascun lotto e sono indicati nella scheda dati di controllo qualità.

Le prestazioni del dosaggio dovrebbero essere dentro i limiti stabiliti e l'accettabilità del laboratorio. Se le prestazioni non correlano con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue:

i) Avete utilizzato reagenti refrigerati (2-8 °C) durante il dispensamento (punti 3-10)? ii) accuratezza delle pipette, termometri e timer; iii) impostazioni del lavaggio ELISA e lettore; iv) Data di scadenza dei reagenti; v) Conservazione e condizioni d'incubazione; vi) La soluzione di Substrato TMB deve essere incolore; vii) Purezza dell'acqua.

STANDARDIZZAZIONE

Il Calibratore è stato calibrato verso un pool di riferimento interno, ed è stato calibrato a 100 % Rapporto.

RISULTATI E CALCOLO

Calcolo dei risultati:

- Annotare l'assorbanza (OD) a 450 nm per ciascun pozzetto (calibratore, controlli e campioni).
- Media dei valori di calibratore e controlli in duplicato (se disponibili).
- I risultati sono espressi come rapporto tra l'assorbanza dei campioni e l'assorbanza (media) del calibratore.

Isotipi IgG/IgM mix

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

Isotipi IgG e IgM

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

Programmi che calcolano direttamente i risultati in rapporto percentuale, sono già presenti su molti lettori per piastra.

Importante: I risultati presentati nelle tabelle 7 e 8 sono esempi. Calibratore e controlli devono essere utilizzati in ogni singola prova.

LIMITAZIONI

- Si consiglia di discutere i risultati di zona grigia e i positivi ottenuti con la mix di marcatori enzimatici IgG/IgM con un medico o neurologo di riferimento, prima di procedere con la determinazione dell'isotipo individuale con marcatori enzimatici IgG e IgM.
- Le risposte autoimmuni dominanti possono essere accompagnate da reattività crociata con altri gangliosidi analizzati. La reattività crociata evidenzia solitamente un'elevata variazione tra dosaggi diversi e può non essere clinicamente rilevante. L'interpretazione dei risultati deve pertanto essere condotta solo assieme a un esperto/specialista.
- Data la polireattività degli anticorpi autoimmuni (rif. 6) e le differenze nella prevalenza geografica, i risultati del dosaggio devono essere utilizzati solo per confermare l'interpretazione clinica della neuropatia da parte di un esperto/specialista unitamente al quadro clinico del paziente.
- Il test BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA non è stato convalidato per i campioni ottenuti da plasmateresi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Limitazioni corrispondenti, ove presenti, sono indicate con numeri in apice.

	Isotipo: IgG/IgM Mix		
Categorie Titolo/ Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativo	Fare riferimento alle limitazioni ¹	Fare riferimento alle limitazioni ¹
GQ1b			
GM1			

Tabella 12

	Isotipo: IgG		
Categorie Titolo/ Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativo	Ripetere il test in un punto secondo momento	Positivo
GQ1b			
GM1			

Tabella 13

	Isotipo: IgM		
Categorie Titolo/ Ratio (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativo	Ripetere il test in un punto secondo momento	Positivo
GQ1b			
GM1			

Tabella 14

INTERVALLO DI REFERENZA E CUT-OFF

In cooperazione con le istituzioni indicate, abbiamo stabilito un cut-off clinico del 50 %. Valori <30 % si possono classificare come decisamente negativi. Il rapporto percentuale dei titoli sono stati stabiliti su n = 100 donatori volontari¹ (uomini e donne adulti, tra i 18 e 70 anni) e n = 277 sieri patologici². I sieri sono stati dosati in ogni singolo ganglioside (GM1, GD1b e GQ1b), secondo la procedura del test. I risultati dei donatori di sangue sono presentati nella tabella 16.

Linee guida per l'utilizzo di cut-off e categorie titre / rapporto (%):

Interpretazione clinica	Categorie Titre / rapporto (%)
Negativo	<30
Zona grigio	30-50
Cut-off	50
Positivo	>50-100
Fortemente positivo	>100

Tabella 6

¹ Raccolti presso il centro di donazione di sangue, l'ospedale universitario di Basilea.

² Ricevuto da Friedrich-Baur-Istituto Ludwig-Maximilians-University di Monaco; Dipartimento di Neurologia, Università di Basilea; Neurologique, Università di Lyon.

PRESTAZIONI DEL DOSAGGIO

Precisione intra-dosaggio (intratest):

GD1b: 2.3-4.4 % CV; GQ1b: 2.6-5.2 % CV;

GM1: 1.4-5.7 % CV.

Per ciascuna delle tre micropiastre precoattate con gangliosidi del test BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA, sono stati selezionati due sieri positivi di anti-gangliositi. I campioni di siero sono stati dosati in dodici repliche in un singolo run per ciascun tracciante enzimatico: Mix di IgG/IgM, IgG e IgM. La precisione intra-dosaggio è risultata essere nell'intervallo compreso da 2.6 a 4.5 % CV per la mix di traccianti enzimatici, 2.5 a 5.7 % CV per il tracciante enzimatico IgG e da 1.4 a 5.2 % CV per il tracciante enzimatico IgM. Lo studio è stato eseguito con un lotto di reagenti. I risultati sono riassunti nelle tabelle 9, 10 e 11.

Precisione inter-dosaggio (between-run):

GD1b: 8.0-13.2 % CV; GQ1b: 8.2-19.6 % CV;

GM1: 9.0-21.0 % CV.

Per ciascuna delle tre micropiastre precoattate con gangliosidi del test BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA, sono stati selezionati due sieri positivi di anti-gangliositi. I campioni di siero sono stati dosati in 20 repliche indipendenti in un singolo run per giorno, di ciascun tracciante enzimatico: Mix di IgG/IgM, IgG e IgM. La precisione inter-dosaggio è risultata essere nell'intervallo compreso da 8.2 a 15.2 % CV per il mix di traccianti enzimatici, 11.6 a 21.0 % CV per il tracciante enzimatico IgG e da 8.0 a 15.6 % CV per il tracciante enzimatico IgM. Lo studio è stato eseguito con un lotto di reagenti. I risultati sono riassunti nelle tabelle 12, 13 e 14.

Limite del Bianco (LoB): ≤6.1 % rapporto

Il Limite del Bianco (LoB) è stato determinato secondo la direttiva EP17-A della CLSI. Sono stati dosati dodici repliche di bianco (tampone di incubazione) per gangliosidi in un singolo run per tutti e tre i traccianti enzimatici: Mix di IgG/IgM, IgG e IgM. Il Limite del Bianco (LoB) espresso come il rapporto % dell'assorbanza del calibratore è risultato essere al 6.1 % per il mix del tracciante enzimatico IgG/IgM, ≤3.1 % per il tracciante enzimatico IgG e ≤2.6 % per il tracciante enzimatico IgM. Per determinare il Limite del Bianco (LoB) complessivo è stato considerato il Limite del Bianco (LoB) più alto ottenuto con i tre differenti traccianti enzimatici. Lo studio è stato eseguito con un lotto di reagenti. Il Limite del Bianco (LoB) è stato calcolato usando una analisi parametrica.

Limite di Quantificazione (LoD): ≤8.1 % rapporto

Il Limite di quantificazione (LoD) è stato determinato secondo la direttiva EP17-A della CLSI. Per ciascuna delle tre micropiastre precoattate, un singolo campione clinico, che rappresenta bassa concentrazione di anticorpi, è stato misurato in dodici repliche in un singolo run di ciascuno dei tre traccianti enzimatici: Mix di IgG/IgM, IgG e IgM. Il Limite di Quantificazione (LoD) espresso come il rapporto % dell'assorbanza del calibratore è risultato essere al ≤8.1 % per i traccianti enzimatici del mix di IgG/IgM, ≤6.3 % per il tracciante enzimatico IgG e ≤3.0 % per il tracciante enzimatico IgM. Per determinare il Limite di Quantificazione (LoD) complessivo è stato considerato il Limite di Quantificazione (LoD) più alto ottenuto con i tre differenti traccianti enzimatici. Lo studio è stato eseguito con un lotto di reagenti. Il Limite di Quantificazione (LoD) è stato calcolato usando una analisi parametrica.

Sensibilità Funzionale: ≤8.1 % rapporto

È stato generato un profilo di precisione dai risultati ottenuti nello studio di precisione inter-dosaggio descritto precedentemente, per i due campioni di siero positivi per ciascuna delle tre micropiastre precoattate con gangliosidi e rilevati con ciascuno dei traccianti enzimatici: Mix di IgG/IgM, IgG e IgM. I punti dei dati sono stati interpolati mediante regressione polinomiale non lineare con funzione cubica. È stato determinato l'intervallo di confidenza del 95 % della regressione e la sensibilità funzionale è stata determinata dalla intersezione con la funzione cubica con il criterio di accettazione del 20 % CV. I risultati sono riassunti nella figura 2.

Linearità

L'intervallo di linearità del BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA è stato determinato secondo la direttiva CLSI EP06-A. Sono stati impiegati sieri multipli con concentrazioni a coprire l'intero l'intervallo di misurazione del test, consentendo la valutazione della maggior parte delle combinazioni possibili gangliosidi/tracciante enzimatico. I campioni di siero sono stati diluiti secondo le istruzioni per l'uso. In caso di campioni di siero altamente positivi è stata applicata una diluizione più elevate pari a 1:2000. Da ciascun campione sono state preparate diluizioni seriali con gradazione del 10 % con tampone di incubazione come diluente. La linearità è stata definita come l'intervallo nel quale la differenza relativa tra l'interpolazione lineare e una interpolazione polinomiale di ordine maggiore, se significativa, era inferiore al 20 %. Per rapporti ≤ 25 % è stata consentita una differenza assoluta al di sotto del 5 % del rapporto. E' stato confermato un intervallo di linearità che copre e supera le categorie di titolazione del BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA di <30 % - negativo; 30-50 % - zona-grigia; 50-100 % positivo e >100 % fortemente positive. I risultati sono riassunti nella tabella 15.

INTERFERENZE

Nessuna interferenza è stata riscontrata per le seguenti sostanze alle concentrazioni elencate: bilirubina non coniugata (siero itterico): 40 mg/d; bilirubina coniugata (siero itterico): 60 mg/dL; emoglobina (siero emolizzato): 400 mg/dL; emolizzato (sangue emolizzato): 400 mg/dL e Trigliceridi (Intralipid®): 3000 mg/dL.

USO PREVISTO

BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA es una prueba diagnóstica in vitro destinada a la detección de anticuerpos frente a los antígenos neurales definidos como relevantes GM1, GD1b y GQ1b (IgG e IgM) en muestras de suero de pacientes con sospecha de neuropatías periféricas de etiología desconocida. Permite la clasificación cuantitativa de los resultados en categorías de título y sirve como ayuda en el diagnóstico de neuropatías (ref. 1-7).

APLICACIÓN PREVISTA

Con respecto a los 3 marcadores enzimáticos diferentes, los componentes del dispositivo permiten tres opciones de aplicación:

1. Realización de la prueba con el conjugado mezcla de IgG/IgM, que permite detectar la presencia de anticuerpos que indica una posible neuropatía autoinmune.
2. Realización de la prueba con conjugados de IgG y/o IgM individuales para la determinación de isotipos de los anticuerpos.
3. Para la rutina de laboratorio, el cribado inicial de las muestras utilizando la mezcla de marcadores enzimáticos de IgG/IgM (opción 1) puede ir seguido por la diferenciación de las muestras positivas para la mezcla utilizando los conjugados de IgG e IgM individuales (opción 2) tras consulta previa con un clínico o un neurólogo remitente.

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

La prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA se basa en la técnica de ensayo inmunométrico enzimático. Los pocillos de la placa de microtitulación suministrada están recubiertos con gangliósidos: GM1, GD1b y GQ1b. El calibrador, los controles y los sueros de paciente se incuban en los pocillos de microtitulación, con lo que los anticuerpos frente a gangliósidos presentes en las muestras se unen a los gangliósidos inmovilizados. Tras un lavado para retirar las sustancias no unidas, esos anticuerpos se detectan con anticuerpos frente a IgG y/o IgM humanas marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un segundo paso de lavado en el que se retira el marcador enzimático no unido, se añade una solución sustrato que contiene tetrametilbencidina (TMB). Se desarrolla así una coloración azul proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos en los gangliósidos inmovilizados. El desarrollo de color se detiene añadiendo una solución de interrupción ácida (ácido sulfúrico diluido) que hace virar la solución azul hacia el amarillo. Se mide entonces la intensidad del color a 450 nm. La absorbancia medida es proporcional al título de anticuerpos presente en una determinada muestra. Los títulos de anticuerpos se expresan como relaciones porcentuales con respecto al calibrador y pueden asignarse a distintas categorías de título (negativo, zona gris, positivo y fuertemente positivo).

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Placa de microtitulación Previamente recubierta con gangliósidos	12 x 8 pocillos	B-GCL-MP	Listo para usar
Sellador de placas	3 unidades		
Tampón de lavado concentrado (10 veces) con conservantes	1 frasco 100 mL	B-GCO-WB	Diluir con 900 mL de agua desionizada
Tampón de incubación con conservantes	1 frasco 100 mL	B-GCO-IB	Listo para usar
Calibrador Liofilizado con conservantes	1 vial	B-GCO-CA	Añadir 1,5 mL de tampón de incubación
Controles negativo, bajo y medio Liofilizados con conservantes	3 viales	B-GCO-CONSET	Añadir 1,5 mL de tampón de incubación
Marcador enzimático de IgG Anticuerpo anti-IgG humana conjugado con HRP en un tampón proteico con conservantes	1 vial 11 mL	B-GCO-ELG	Listo para usar
Marcador enzimático de IgM Anticuerpo anti-IgM humana conjugado con HRP en un tampón proteico con conservantes	1 vial 11 mL	B-GCO-ELM	Listo para usar
Mezcla de marcadores enzimáticos Anticuerpos anti-IgG e IgM humanas conjugados con HRP en un tampón proteico con conservantes	1 vial 11 mL	B-GCO-ELGM	Listo para usar
Sustrato TMB TMB en tampón citrato	1 vial 11 mL	B-TMB	Listo para usar
Solución de interrupción Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 11 mL	B-ST5	Listo para usar Agente corrosivo

Tabla 1

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

Reactivos sellados / sin abrir	
Todos los componentes del kit sellados/sin abrir permanecen estables a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.	
Reactivos abiertos / reconstituídos	
Placa de microtitulación	Devolver inmediatamente las tiras no utilizadas a la bolsa de aluminio que contiene los paquetes de desecante y volver a sellar la bolsa presionando el mecanismo de cierre del borde en toda su longitud. Conservar durante un periodo de hasta 4 meses entre 2 y 8 °C.
Tampón de lavado diluido	Conservar durante un periodo de hasta 4 meses entre 2 y 8 °C.
Calibrador	Conservar durante un periodo de hasta 4 meses entre 2 y 8 °C. ¡No congelar!
Controles	
Tampón de incubación	Conservar-entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
Marcadores enzimáticos	
Sustrato TMB	
Solución de interrupción	Conservar entre 18 y 28 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.

Tabla 2

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables: pipetas de 20 µL, 100 µL y 1000 µL.
- Tubos de poliestireno o polipropileno desechables para la preparación de diluciones de la muestra.
- Probeta de 1000 mL para la reconstitución del tampón de lavado.
- Frasco lavador para el tampón de lavado o lavador de placas de microtitulación automático.
- Papel secante.
- Agitador orbital para placas de microtitulación.
- Lector de placas de microtitulación para medir la absorbancia a 450 nm.

PRECAUCIONES

Precauciones de seguridad

- Tanto el calibrador (B-GCO-CA) como los controles (B-GCO-CONSET) de este kit contienen componentes de origen humano. Aunque se han ensayado con resultado negativo para antígeno de superficie del VHB y anticuerpos frente al VHC y el VIH 1/2, los reactivos se deben manejar como si pudieran transmitir infecciones y se deben manipular de conformidad con buenas prácticas de laboratorio utilizando las precauciones apropiadas.
- Solución de interrupción: La solución de parada (B-ST5) contiene ácido sulfúrico (0,25 M). El reactivo es irritante para los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evitar el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Tras un contacto con los ojos o la piel, lavar inmediatamente con abundante agua.
- Reactivos: Evitar el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con cantidades generosas de agua; de lo contrario, se pueden producir irritación o quemaduras.
- La solución no utilizada se debe desechar conforme a las normativas locales, estatales y federales.

Precauciones técnicas

- Lea atentamente las instrucciones antes de llevar a cabo el análisis. El rendimiento de la prueba se verá adversamente afectado si los reactivos se diluyen de manera incorrecta, se modifican o se conservan en condiciones distintas de las indicadas en estas instrucciones de uso.
- La presencia de residuos en los pocillos de la placa de microtitulación es resultado del proceso de producción. Los residuos se retiran en el paso de lavado (paso nº 3 del procedimiento de ensayo) y no afectan a los resultados.
- Prepare los reactivos antes de iniciar el procedimiento de ensayo. Los reactivos empleados en los pasos nº 3 a 9 deben estar fríos (entre 2 y 8 °C) y mantenerse fríos durante el pipeteo y el lavado. Ponga el sustrato TMB a temperatura ambiente (entre 18 y 28 °C).

- Pasos nº 3 a 9: Utilice reactivos fríos (entre 2 y 8 °C) en todos estos pasos y manténgalos fríos durante el pipeteo. Recomendación: Preparar el tampón de lavado por la noche antes de realizar el ensayo y manténgalo en el refrigerador durante la noche.
- Pasos de lavado nº 3, 6 y 9: Los pasos de lavado son cruciales para retirar los residuos presentes en los pocillos de la placa de microtitulación como resultado del proceso de producción (paso nº 3) así como cualquier anticuerpo no unido (pasos nº 6 y 9).
→ Realice siempre los pasos de lavado con tampón de lavado frío (entre 2 y 8 °C).
→ Asegúrese de que los pocillos estén completamente vacíos tras el último ciclo de lavado.
- Paso nº 9: Ajuste el sustrato TMB a temperatura ambiente (entre 18 y 28 °C) antes de utilizarlo.
- Paso nº 11: Agite las placas de microtitulación durante la incubación con sustrato. Dependiendo del agitador de placas orbital, recomendamos una velocidad de entre 400 y 600 rpm. La solución debería moverse en los pocillos pero sin derramarse fuera.
- Si se utiliza un lavador automatizado, se deberá elegir el "modo placa" para que el dispensado se realice de manera secuencial en todas las tiras antes de proceder a la aspiración.
- Los componentes no se deben utilizar más allá de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No se deben mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Se deben realizar los máximos esfuerzos para asegurar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos y muestras o entre pocillos.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

- El procedimiento requiere <0,1 mL de sangre y <50 µL de suero respectivamente.
- Consulte en la página 26 la información sobre interferencias de muestras hemolizadas, lipémicas o ictéricas.
- Recoja la sangre en tubos sencillos (sin anticoagulante), evite su hemólisis, déjela coagular durante una hora, centrifúguela durante 10 minutos a aproximadamente 1500 x g a temperatura ambiente (entre 18 y 28 °C) y recoja el suero.
- Recomendamos congelar alícuotas de las muestras de paciente cuando sea necesario conservar las muestras, a fin de evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.
- Conserve las muestras de suero a ≤ -20 °C durante un periodo de hasta 4 meses. Para la conservación a largo plazo recomendamos una temperatura de -70 °C (las muestras se mantienen estables durante >1 año). Las muestras congeladas deben ser descongeladas y mezcladas bien mediante vórtex antes de utilizarlas.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Se puede elegir entre tres opciones básicas:

- (1) Detección de isotipos mezcla de IgG/IgM: pasos 4a-4e y 7.
- (2) Detección de isotipos de IgG e IgM: pasos 4a'-4f' y 7'.
- (3) Método en dos pasos: Opción 1 → anticuerpos autoinmunes, muestras positivas → Opción 2.

Nota: Equilibre el sustrato TMB a temperatura ambiente (entre 18 y 28 °C).

1. Diluya todas las muestras de pacientes a estudiar en proporción 1:50 con tampón de incubación. Utilice 30 µL de suero + 1470 µL de tampón de incubación (¡frío: entre 2 y 8 °C!). Mezcle mediante vórtex y deje tanto las muestras diluidas como el calibrador y los controles reconstituidos durante 30 minutos a entre 2 y 8 °C antes de proceder al pipeteo (consulte los pasos 4a y 4b).
2. Prepare un bastidor de placa con el número de tiras necesario para ensayar las muestras de pacientes. Vuelva a sellar inmediatamente las tiras restantes dentro de la bolsa de aluminio junto con los paquetes de desecante. Consérvelas refrigeradas.

Nota: Utilice reactivos fríos en los pasos nº 3 a 9.

3. Lave los pocillos recubiertos dos veces utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado ¡frío! por pocillo. Vacíe los pocillos y golpee firmemente la placa sobre papel secante para eliminar completamente el líquido restante.

Nota: Proceda inmediatamente con los pasos siguientes.

Opción 1: Detección de isotipos mezcla de IgG/IgM

- 4a. Calibrador: Pipetee 100 µL de calibrador en el pocillo A1 (consulte la figura 1A).
- 4b. Controles: Pipetee 100 µL de control medio en el pocillo B1, de control bajo en el pocillo A2 y de control negativo en el pocillo B2 (consulte la figura 1A).

Nota: Si se utilizan más de tres tiras en cada ejecución analítica, el calibrador y los controles se pueden ensayar por duplicado (consulte la figura 1A).

- 4c. Suero de paciente: Pipetee 100 µL de suero del paciente nº 1 diluido en los pocillos C1 a E1 (consulte la figura 1A).
- 4d. Suero de paciente: Pipetee 100 µL de suero del paciente nº 2 diluido en los pocillos F1 a H1 (consulte la figura 1A).
- 4e. Pipetee 100 µL de los sueros de los pacientes nº 3 a 24 diluidos en los pocillos subsiguientes (consulte la figura 1A).

Opción 2: Detección de isotipos de IgG

- 4a'. Calibrador: Pipetee 100 µL de calibrador en el pocillo A1 (consulte la figura 1B).
- 4b'. Controles: Pipetee 100 µL de control medio en el pocillo B1, de control bajo en el pocillo A2 y de control negativo en el pocillo B2 (consulte la figura 1B).

Nota: Si se utilizan más de tres tiras por isotipo, el calibrador y los controles se pueden ensayar por duplicado (consulte la figura 1B).

- 4c'. Suero de paciente: Pipetee 100 µL de suero del paciente nº 1 diluido en los pocillos C1 a E1 (consulte la figura 1B).

4d'. Suero de paciente: Pipetee 100 µL de suero del paciente nº 2 diluido en los pocillos C1 a H1 (consulte la figura 1B).

4e'. Pipetee 100 µL de los sueros de los pacientes nº 3 a 12 diluidos en los pocillos subsiguientes.

Detección de isotipos de IgM.

4f'. Repita los pasos 4a'-4e' utilizando los pocillos subsiguientes o una placa de microtitulación nueva en caso necesario (consulte la figura 1B).

Para las opciones 1 y 2: Incubación de las muestras y lavados

5. Cubra la placa con un sellador de placas e incúbela durante 2 horas ± 5 minutos a entre 2 y 8 °C (no agite la placa).
6. Retire el sellador de placas. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado frío (entre 2 y 8 °C) por pocillo. Vacíe los pocillos y golpee firmemente la placa sobre papel secante para eliminar completamente el tampón de lavado.

Para la opción 1: Detección de isotipos mezcla de IgG/IgM

7. Añada a los pocillos 100 µL de la mezcla de marcadores enzimáticos de IgG/IgM.

Para la opción 2: Detección de isotipos de IgG e IgM

7'. Añada 100 µL de marcador enzimático de IgG o IgM a los respectivos pocillos (consulte la figura 1B).

Para las opciones 1 y 2: Incubación con marcadores enzimáticos, lavados y detección

8. Cubra la placa con un sellador de placas e incúbela durante 2 horas ±5 minutos-entre 2 y 8 °C (no agite la placa).
9. Retire el sellador de placas. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado frío (entre 2 y 8 °C) por pocillo. Vacíe los pocillos y golpee firmemente la placa sobre papel secante.

Nota: Ajuste la solución sustrato TMB a temperatura ambiente (entre 18 y 28 °C).

10. Añada 100 µL de la solución sustrato TMB a cada pocillo.
11. Cubra la placa con un sellador de placas e incúbela en un agitador de placas orbital a entre 400 y 600 rpm durante 30 ± 2 minutos entre 18 y 28 °C. Proteja la placa de la luz directa.
12. Añada 100 µL de solución de interrupción a todos los pocillos. Proceda con el paso nº 13 antes de pasados 30 minutos.
13. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

CONTROL DE CALIDAD

Para obtener resultados fiables se requiere una comprensión adecuada de estas instrucciones de uso. Solo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (según las directrices de BPL vigentes) y siguiendo de manera exacta las instrucciones de uso.

Puesto que no existe ningún suero de control de anticuerpos antigangliósidos disponible comercialmente, recomendamos utilizar una combinación de suero positivo y negativo con fines de control de calidad interno.

Se recomienda un valor mínimo de DO 1,2 para el calibrador. Todos los controles deben estar dentro de los intervalos esperados establecidos (relación porcentual). Los intervalos esperados para los controles son específicos del lote y vienen indicados en la ficha de datos de CC.

Las características del rendimiento deben estar dentro de los límites establecidos. Si esas características no son conformes con los límites establecidos y la repetición del ensayo permite excluir errores de manipulación, compruebe las posibles fuentes de problemas siguientes: i) ¿se han mantenido a entre 2 y 8 °C todos los reactivos utilizados en los pasos nº 3 a 10?, ii) exactitud de las pipetas, los termómetros y los cronómetros, iii) parámetros del lavador y el lector de ELISA, iv) fecha de caducidad de los reactivos, v) condiciones de conservación e incubación, vi) color de la solución sustrato TMB (debe ser incolora), vii) pureza del agua.

ESTANDARDIZACIÓN

El calibrador incluido en este kit ha sido calibrado frente a material de referencia interno. Se ha ajustado para una relación del 100 %.

RESULTADOS Y CÁLCULO

Cálculo de los resultados:

- Registre la absorbancia (DO) a 450 nm de cada pocillo (calibrador, controles y muestras de pacientes).
- Promedie los valores de calibrador y controles duplicados (si están disponibles).
- Los resultados se expresan como la relación entre la absorbancia de las muestras y la absorbancia (promediada) del calibrador.

Isotipos mezcla de IgG/IgM

Relación porcentual: $\frac{\text{absorbancia de las muestras o los controles}}{\text{absorbancia del calibrador}} \times 200$

Isotipos de IgG e IgM

Relación porcentual: $\frac{\text{absorbancia de las muestras o los controles}}{\text{absorbancia del calibrador}} \times 100$

La mayoría de los lectores de microplacas disponen de programas para calcular los resultados como relaciones porcentuales.

Nota: Los resultados que se presentan en las tablas 7 y 8 son ejemplos. Es preciso utilizar el calibrador y los controles en cada ensayo individual.

LIMITACIONES

- Se recomienda discutir con un clínico o un neurólogo remitente los resultados en zona gris y positivos obtenidos con la mezcla de marcadores enzimáticos de IgG/IgM antes de proceder a la determinación adicional de isotipos con los marcadores enzimáticos de IgG e IgM individuales.
- Las respuestas autoinmunitarias dominantes pueden ir acompañadas de reactividad cruzada con otros gangliósidos ensayados. La reactividad cruzada mostrará por lo general una alta variación interensayo y puede ser clínicamente irrelevante. La interpretación de los resultados debe, por tanto, hacerse únicamente de manera conjunta con un experto/especialista.
- Debido a la polirreactividad de los anticuerpos autoinmunitarios (ref. 6) y las diferencias de prevalencia geográfica, los resultados del ensayo sólo se deben utilizar para respaldar la interpretación clínica de la neuropatía hecha por un experto/especialista en combinación con el cuadro clínico del paciente.
- La prueba BÜHLMANN GanglioCombⁱ™ Light ELISA no ha sido validada para muestras de plasmáfesis.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Las limitaciones aplicables, cuando corresponda, se indican mediante números en superíndice.

	Isotipo: IgG/IgM Mix		
Categoría de título / Relación (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativo	Consultar las limitaciones ¹	Consultar las limitaciones ¹
GQ1b			
GM1			

Tabla 15

	Isotipo: IgG		
Categoría de título / Relación (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativo	Repetir la prueba más adelante	Positivo
GQ1b			
GM1			

Tabla 16

	Isotipo: IgM		
Categoría de título / Relación (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativo	Repetir la prueba más adelante	Positivo
GQ1b			
GM1			

Tabla 17

INTERVALOS DE REFERENCIA Y RELACIONES DE CORTE

En cooperación con las instituciones mencionadas a continuación, se ha establecido un valor de corte del 50 %. Los valores <30 % se han clasificado claramente como negativos. Las categorías de título establecidas están basadas en un número n = 100 donantes de sangre¹ (hombres y mujeres adultos de entre 18 y 70 años de edad) y un número n = 277 muestras patológicas². Los sueros se ensayaron para cada uno de los 3 gangliósidos (GM1, GD1b y GQ1b) según el procedimiento de ensayo. Los resultados de donantes de sangre normal se muestran en la tabla 16.

Directrices de uso del valor de corte y las categorías de título / relaciones porcentuales:

Interpretación clínica	Categorías de título / rapporto (%)
Negativo	<30
Zona gris	30-50
Cut-off	50
Positivo	>50-100
Fuertemente positiva	>100

Tabla 6

¹) muestras recogidas en el centro de donación de sangre del Hospital Universitario de Basilea

²) muestras recibidas del Instituto Friedrich-Baur, Universidad Ludwig-Maximilian de Munich; Departamento de Neurología de la Universidad de Basilea; Departamento de Neurología de la Universidad de Lyon.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Precisión intraensayo (dentro de una misma ejecución):

GD1b: 2.3-4.4 % CV; GQ1b: 2.6-5.2 % CV;

GM1: 1.4-5.7 % CV.

Para cada uno de los tres gangliósidos de recubrimiento de la placa de microtitulación de la prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA, se seleccionaron dos sueros positivos para anticuerpos frente al gangliósido. Las muestras de suero se ensayaron en doce réplicas en una única ejecución para cada uno de los marcadores enzimáticos: mezcla IgG/IgM, IgG e IgM. La precisión intraensayo se determinó como dentro del rango de entre 2,6 y 4,5 % CV para la mezcla de marcadores enzimáticos, entre 2,5 y 5,7 % CV para el marcador enzimático de IgG y entre 1,4 y 5,2 % CV para el marcador enzimático de IgM. El estudio se realizó con un lote de reactivo. Los resultados se resumen en las tablas 9, 10 y 11.

Precisión interensayo (entre ejecuciones):

GD1b: 8.0-13.2 % CV; GQ1b: 8.2-19.6 % CV;

GM1: 9.0-21.0 % CV.

Para cada uno de los tres gangliósidos de recubrimiento de la placa de microtitulación de la prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA, se seleccionaron dos sueros positivos para anticuerpos frente al gangliósido. Las muestras de suero se ensayaron en réplicas individuales en 20 ejecuciones independientes, una ejecución al día, para cada uno de los marcadores enzimáticos: mezcla IgG/IgM, IgG e IgM.

La precisión interensayo se determinó como dentro del rango de entre 8,2 y 15,2 % CV para la mezcla de marcadores enzimáticos, entre 11,6 y 21,0 % CV para el marcador enzimático de IgG y entre 8,0 y 15,6 % CV para el marcador enzimático de IgM. El estudio se realizó con un lote de reactivo. Los resultados se resumen en las tablas 12, 13 y 14.

Límite del blanco (LoB): ≤6,1 % relación

El LoB se estableció de conformidad con la directriz CLSI EP17-A. Se ensayaron doce réplicas del blanco (tampón de incubación) por gangliósido en una única ejecución para los tres marcadores enzimáticos: mezcla IgG/IgM, IgG e IgM. El límite del blanco (LoB) expresado como la relación porcentual con respecto a la absorbancia del calibrador se calculó como del 6,1 % para la mezcla de marcadores enzimáticos de IgG/IgM, ≤3,1 % para el marcador enzimático de IgG y ≤2,6 % para el marcador enzimático de IgM. El valor de LoB más alto obtenido con los tres marcadores enzimáticos diferentes se utilizó para determinar el límite del blanco (LoB) global. El estudio se realizó con un lote de reactivo. El LoB se evaluó mediante análisis paramétrico.

Límite de detección (LoD): ≤8,1 % relación

El LoD se estableció de conformidad con la directriz CLSI EP17-A. Para cada uno de los tres gangliósidos de recubrimiento de la placa de microtitulación, se midió una única muestra clínica que presentaba una concentración baja de anticuerpos en doce réplicas en una única ejecución para cada uno de los tres marcadores enzimáticos: mezcla IgG/IgM, IgG e IgM. El LoD expresado como la relación porcentual con respecto a la absorbancia del calibrador se calculó como ≤8,1 para la mezcla de marcadores enzimáticos de IgG/IgM, ≤6,3 % para el marcador enzimático de IgG y ≤3,0 % para el marcador enzimático de IgM. El valor de LoD más alto obtenido con los tres marcadores enzimáticos diferentes se utilizó para determinar el límite de detección (LoD) global. El estudio se realizó con un lote de reactivo. El LoD se calculó mediante análisis paramétrico.

Sensibilidad funcional: ≤8,1 % relación

Se generó un perfil de precisión a partir de los resultados obtenidos en el estudio de la precisión interensayo anteriormente descrito, para dos muestras de suero positivas para cada uno de los tres gangliósidos de recubrimiento de la placa de microtitulación y detectados con cada uno de los marcadores enzimáticos: mezcla IgG/IgM, IgG e IgM. Los puntos de datos se ajustaron utilizando un ajuste no lineal polinómico con una función cúbica. Se determinaron los intervalos de confianza del 95 % del ajuste y se determinó la sensibilidad funcional como la intersección del ajuste cúbico con el criterio de aceptación del 20 % CV. Los resultados se resumen en la figura 2.

Linealidad

El rango lineal de la prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA se determinó de conformidad con la directriz CLSI EP06-A. Se utilizaron varios sueros con concentraciones que abarcan todo el rango de medición de la prueba, haciendo posible la evaluación de la mayoría de las combinaciones gangliósido/marcador enzimático. Las muestras de suero se diluyeron según las instrucciones de uso. Para las muestras de suero fuertemente positivo se aplicó una dilución mayor, de 1:2000. Seguidamente se prepararon series de dilución de cada muestra en graduaciones del 10 % utilizando tampón de incubación como diluyente. La linealidad se definió como el intervalo en el cual la diferencia relativa entre el ajuste lineal y, cuando sea significativo, el ajuste polinómico de orden superior es inferior al 20 %. Para relaciones ≤ 25 % se permitió una diferencia absoluta inferior al 5 %. Se confirmó la existencia de un rango lineal que cubre y excede las categorías de título de la prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA de <30 % - negativo; 30-50 % - zona gris; 50-100 % - positivo y >100 % - fuertemente positivo. Los resultados se resumen en la tabla 15.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

No se detectó ninguna interferencia con las siguientes sustancias hasta las concentraciones siguientes: bilirrubina no conjugada (suero icterico): 40 mg/dL; bilirrubina conjugada (suero icterico): 60 mg/dL; hemoglobina (suero hemolizado): 400 mg/dL; hemolizado (sangre hemolizada): 400 mg/dL; y triglicéridos (Intralipid®): 3000 mg/dL.

PORTUGUÊS

APLICAÇÃO DO TESTE

O BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA é um teste de diagnóstico *in vitro* para detecção de anticorpos contra antígenos neurais relevantes definidos GM1, GD1b e GQ1b (IgG e IgM) em amostras de soro de pacientes com suspeita de neuropatias periféricas de etiologia desconhecida. Ele permite a classificação quantitativa dos resultados em categorias de títulos e serve como um auxiliar no diagnóstico de neuropatias (ref. 1-7).

APLICAÇÃO PRETENDIDA

Com relação aos 3 marcadores enzimáticos diferentes, os componentes do dispositivo permitem três opções de aplicação:

1. O teste com conjugados combinados IgG/IgM permite identificar a presença de anticorpos e indicar uma possível neuropatia autoimune.
2. O teste com conjugados IgG e/ou IgM individuais para a determinação de isotipos de anticorpos.
3. Para testes de laboratório, a triagem de amostras iniciais usando o mix de marcadores enzimáticos IgG/IgM (opção 1) pode ser seguida de diferenciação de amostras positivas do mix usando conjugados IgG e IgM individuais (opção 2), depois de consulta prévia com um clínico/neurologista requisitante.

PRINCÍPIO DO TESTE

O BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA se baseia na técnica de ensaio imunométrico enzimático. Os poços na placa de microtitulação Microtiter fornecida são revestidos com os gangliosídeos GM1, GD1b e GQ1b.

O calibrador, os controles e o soro dos pacientes são incubados nos poços de microtitulação e os anticorpos antigangliosídeos presentes nas amostras ligam-se aos gangliosídeos imobilizados. Depois da lavagem para remoção das substâncias não ligadas, os anticorpos são detectados com peroxidase de raiz-forte (HRP) contra o IgG e/ou o IgM humanos. Após uma segunda etapa de lavagem, na qual o marcador enzimático não fixado é removido, uma solução de substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) é adicionada. Uma cor azul surgirá, proporcional à quantidade de anticorpos ligados aos gangliosídeos imobilizados. O desenvolvimento da cor é interrompido adicionando-se uma solução de parada ácida (ácido sulfúrico diluído), que muda a cor da solução de azul para amarelo. A intensidade da cor é medida em 450 nm.

A absorbância medida é proporcional ao título dos anticorpos presentes em uma determinada amostra. Os títulos dos anticorpos são expressos como relação percentuais (%) do calibrador e podem receber quatro categorias de títulos (negativo, zona cinza, positivo e fortemente positivo).

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Qtde	Código	Reconstituição
Placa de microtitulação pré-revestida com gangliosídeos	12 x 8 poços	B-GCL-MP	Pronto para uso
Selador da placa	3 peças		
Tampão de Lavagem Concentrado (10X) com preservativos	1 tubo da 100 mL	B-GCO-WB	Diluir com 900 mL de H ₂ O deionizada
Tampão de incubação com preservativos	1 tubo da 100 mL	B-GCO-IB	Pronto para uso
Calibradores Liofilizado com conservantes	1 frascos	B-GCO-CA	Adicionar 1,5 mL de tampão de incubação
Controle negativo, baixo e medio Liofilizado com conservantes	3 frascos	B-GCO-CONSET	Adicionar 1,5 mL de tampão de incubação
Marcador enzimático IgG IgG Ab anti-humano conjugado à HRP em um tampão à base de proteína com conservantes	1 frascos da 11 mL	B-GCO-ELG	Pronto para uso
Marcador enzimático IgM IgM Ab anti-humano conjugado à HRP em um tampão à base de proteína com conservantes	1 frascos da 11 mL	B-GCO-ELM	Pronto para uso
Marcador enzimático combinados IgG e IgM Ab anti-humano conjugado à HRP em um tampão à base de proteína com conservantes	1 frascos da 11 mL	B-GCO-ELGM	Pronto para uso
Substrato TMB TMB em tampão de citrato	1 frascos da 11 mL	B-TMB	Pronto para uso
Solução stop 0,25 M de ácido sulfúrico	1 frascos da 11 mL	B-ST5	Pronto para uso Agente corrosivo

Tabela 1

ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

Reagentes não abertos	
Armazenar a 2-8 °C. Não use depois da data de expiração do kit impresso nas etiquetas.	
Reagentes abertos / reconstituídos	
Microplaca	Devolver imediatamente as fileiras não utilizadas para a bolsa metalizada contendo os sacos de dissecadores e selar novamente a beirada inteira do selo zip. Armazenar a 2-8 °C por um período máximo de 4 meses.
Tampão de lavagem diluído	Armazenar a 2-8 °C por um período máximo de 4 meses.
Calibradores	Armazenar a 2-8 °C por um período máximo de 4 meses. não congele!
Controles	
Tampão de incubação	Armazenar a 2-8 °C até a data de expiração.
Marcador enzimático	
Substrato TMB	
Solução Stop	Armazenar a 18-28 °C até a data de expiração.

Tabela 2

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO INCLUÍDOS

- Pipetas de precisão de 10, 100 e 1000 µL com pontas descartáveis
- Tubos descartáveis de poliestireno ou polipropileno para preparação de diluição de amostras
- Cilindro de 1000 mL para diluir tampão de lavagem
- Lavadora de placa e microtituladora ou garrafa de apertar para tampão de lavagem
- Papel mata-borrão
- Rotador de microplaca.
- Leitor de placa e microplaca para medição de absorvência a 450 nm

PRECAUÇÕES

Medidas de segurança

- Os calibradores (B-GCO-CA) e os controles (B-GCO-CONSET) deste teste contêm componentes de origem humana. Apesar de testados e apresentarem resultado negativo para antígeno de superfície HBV e anticorpos HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manipulados como se fossem capazes de transmitir infecções e devem ser manipulados de acordo com as boas práticas do laboratório, usando as precauções apropriadas.
- Solução stop: A solução de interrupção (B-STTS) contém ácido sulfúrico (0,25 M). O reagente é um irritante dos olhos, pele e membranas mucosas. Evite o contato com os olhos, a pele ou a roupa. Após o contato com os olhos ou a pele, lavar imediatamente com água em abundância.
- Reagentes: Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, leve imediatamente com quantidades abundantes de água, caso contrário, irritação/queimaduras poderão ocorrer.
- A solução não usada deve ser descartada de acordo com as regulamentações locais, estaduais ou federais.

Precauções técnicas

- Componentes do kit: leia atentamente as instruções antes de executar o teste. O desempenho do teste será afetado negativamente se os reagentes forem diluídos incorretamente, modificados ou armazenados em condições diferentes daquelas detalhadas nesta instrução de uso.
- Os resíduos nos poços da placa de microtitulação resultam do processo de produção. Eles são removidos na etapa de lavagem (etapa 3 do procedimento do ensaio) e não afetam os resultados.
- Prepare os reagentes antes de iniciar o procedimento de teste. Os reagentes utilizados nas etapas 3-9 devem estar frios (2-8 °C) e ser mantidos frios durante a pipetagem e lavagem. Deixe que o substrato de TMB atinja a temperatura ambiente (18-28 °C).
- Etapas 3-9: utilize reagentes frios (2-8 °C) em todas estas etapas e mantenha-os frios enquanto estiver pipetando. Recomendação: prepare o tampão de lavagem e o tampão de incubação na véspera da execução do ensaio e deixe-os na geladeira durante toda a noite.

- Etapas de lavagem 3, 6 e 9: as etapas de lavagem são fundamentais para a remoção de resíduos dos poços da placa de microtitulação gerados pelo processo de produção (etapa 3), assim como todos os anticorpos não ligados (etapas 6 e 9).
 - As etapas de lavagem devem ser sempre realizadas com o tampão de lavagem frio (2-8 °C).
 - Certifique-se de que todos os poços estejam completamente vazios depois do último ciclo de lavagem.
- Etapa 9: deixe que o substrato de TMB atinja a temperatura ambiente (18-28 °C) antes de usá-lo.
- Etapa 11: agite as placas de microtitulação durante a incubação com o substrato. A depender do agitador orbital de placas, recomendamos 400-600 rpm. A solução deve se movimentar nos poços, mas sem transbordar nem derramar.
- Se uma lavadora automática for utilizada, o “modo de placa” deve ser selecionado para que a dispensação seja executada sequencialmente em todas as tiras antes da aspiração.
- Os componentes não devem ser usados depois da data de validade impressa nos rótulos.
- Não misture diferentes lotes de reagentes.
- Todas as providências devem ser tomadas para se assegurar que não ocorra contaminação cruzada entre os reagentes, amostras ou entre poços.
- Os micropoços não podem ser reutilizados.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

- O procedimento requer <0,1 mL de sangue e <50 µL de soro, respectivamente.
- Consulte a página 31 para compreender a interferência de amostras hemolisadas, lipêmicas ou ictericas.
- Colete sangue em tubos comuns (sem anticoagulante), evite a hemólise, deixe em repouso para coagular por uma hora, centrifugue por 10 minutos a aproximadamente 1.500 g à temperatura ambiente (18-28 °C) e colete o soro.
- Recomendamos congelar alíquotas de amostras de pacientes, se for necessário armazenar as amostras, evitando-se assim a repetição do ciclo de congelamento/descongelamento.
- Armazene as amostras de soro a ≤-20 °C por até 4 meses. Para o armazenamento de longo prazo, recomendamos uma temperatura de -70 °C (as amostras permanecem estáveis por mais de 1 ano). As amostras congeladas devem ser descongeladas e agitadas em vórtex antes da utilização.

PROCEDIMENTO DE TESTE

Três opções básicas podem ser escolhidas:

- (1) Detecção de isotipos IgG/IgM combinados (mix): etapas 4^a-4e e 7
- (2) Detecção dos isotipos IgG e IgM: etapas 4a'-4f' e 7'
- (3) Métodos de duas etapas: Opção 1 → anticorpos autoimunes, amostras positivas → Opção 2.

Nota: deixe que o substrato de TMB atinja a temperatura ambiente (18-28 °C).

1. Dilua todas as amostras de pacientes a serem investigadas na proporção de 1:50 com o tampão de incubação. Use 30 µL de soro + 1470 µL (frio: 2-8 °C!) de tampão de incubação. Misture em agitador vórtex e deixe as amostras diluídas, o calibrador e os controles reconstituídos em repouso por 30 minutos a 2-8 °C antes de pipetar (consulte as etapas 4a e 4b).
2. Prepare uma placa com a quantidade de tiras necessária para testar as amostras dos pacientes. Sele as tiras remanescentes imediatamente na embalagem de alumínio, juntamente com os sachês de dessecante. Armazene sob refrigeração.

Nota: use reagentes frios nas etapas 3 a 9.

3. Lave os poços revestidos duas vezes, usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão para remover completamente todo o líquido remanescente.

Nota: proceda imediatamente com as próximas etapas.

Opção 1: detecção do mix de isotipos IgG/IgM

- 4a. Calibrador: pipete 100 µL de calibrador no poço A1 (consulte a figura 1A).
 - 4b. Controles: pipete 100 µL de controle médio no poço B1, de controle baixo no poço A2 e de controle negativo no poço B2 (consulte a figura 1A).
- Nota: caso sejam usadas mais de três tiras por série, o calibrador e os controles podem ser testados em duplicata (consulte a figura A).*
- 4c. Soro dos pacientes: pipete 100 µL de soro diluído 1 dos pacientes nos poços C1-E1 (consulte a figura 1A).
 - 4d. Soro dos pacientes: pipete 100 µL de soro diluído 2 dos pacientes nos poços F1-H1 (consulte a figura 1A).
 - 4e. Pipete 100 µL de soro diluído 3-24 dos pacientes nos poços subsequentes (consulte a figura 1A).

Opção 2: detecção de isotipos IgG.

- 4a'. Calibrador: pipete 100 µL de calibrador no poço A1 (consulte a figura 1B).
- 4b'. Controles: pipete 100 µL de controle médio no poço B1, de controle baixo no poço A2 e de controle negativo no poço B2 (consulte a figura 1B).

Nota: caso sejam usadas mais de três tiras por isotipo, o calibrador e os controles podem ser testados em duplicatas (consulte a figura 1B).

- 4c'. Soro dos pacientes: pipete 100 µL de soro diluído 1 dos pacientes nos poços C1-E1 (consulte a figura 1B).
- 4d'. Soro dos pacientes: pipete 100 µL de soro diluído 2 dos pacientes nos poços C1-H1 (consulte a figura 1B).
- 4e'. Pipete 100 µL de soro diluído 3-12 dos pacientes nos poços subsequentes.

Detecção de isotipos IgM.

4f'. Repita as etapas 4a'-4e' usando os poços subsequentes ou uma nova placa de microtitulação, se necessário (consulte a figura 1B).

Para as opções 1 e 2: incubação das amostras e lavagens

5. Cubra a placa com um selador e incube por 2 horas ±5 minutos a 2-8 °C (não agite a placa).
6. Remova o selador da placa. Esvazie os poços e lave três vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio (2-8 °C) por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão para remover o tampão de lavagem completamente.

Para a opção 1: detecção do mix de isotipos IgG/IgM

7. Adicione 100 µL do marcador enzimático IgG/IgM combinado nos poços.

Para a opção 2: detecção dos isotipos IgG e IgM

- 7'. Adicione 100 µL do marcador enzimático IgG ou IgM nos respectivos poços (consulte a figura 1B).

Para as opções 1 e 2: incubação com marcadores enzimáticos, lavagens, detecção.

8. Cubra a placa com um selador e incube por 2 horas ± 5 minutos a 2-8 °C (não agite a placa).
 9. Remova o selador da placa. Esvazie os poços e lave três vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio (2-8 °C) por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão.
- Nota: deixe que o substrato de TMB atinja a temperatura ambiente (18-28 °C).*
10. Adicione 100 µL de solução do substrato de TMB a cada poço.
 11. Cubra a placa com um selador, incube a placa em um agitador orbital a 400-600 rpm por 30 ±2 minutos a 18-28 °C. Proteja a placa contra a luz direta.
 12. Adicione 100 µL de solução de parada a cada poço. Continue com a etapa 13 dentro de 30 minutos.
 13. Leia a absorbância a 450 nm em um leitor de placa de microtitulação.

CONTROLE DE QUALIDADE

Uma boa compreensão destas instruções de uso é necessária para se obter resultados confiáveis. Estes resultados serão obtidos somente por meio do emprego de técnicas laboratoriais precisas (atuais diretrizes das Boas Práticas de Laboratório, BPL) e do cumprimento exato das instruções de uso.

Uma vez que não existe soro de controle para anticorpos antigangliosídeos comercialmente disponíveis, recomendamos o uso de um pool de soros positivos e negativos para controle de qualidade interno.

Um valor mínimo de OD de 1,2 é recomendado para o calibrador. Todos os controles devem estar dentro das faixas esperadas estabelecidas (relação %). As faixas esperadas dos controles são específicas a cada lote e encontram-se indicadas na folha de dados de CQ.

As características de desempenho devem estar dentro de limites estabelecidos. Se essas características não atenderem aos limites estabelecidos e a repetição excluir falhas de manuseio, verifique os seguintes problemas: i) se todos os reagentes usados nas etapas 3-10 foram mantidos a 2-8 °C, ii) a exatidão das pipetas, termômetros e temporizadores, iii) a configuração da lavadora e do leitor do ELISA, iv) a data de validade dos reagentes, v) as condições de armazenamento e incubação, vi) a cor da solução do substrato de TMB (deve ser incolor), e vii) a pureza da água.

PADRONIZAÇÃO

O calibrador incluído neste kit foi calibrado contra material de referência interno. Ele foi ajustado para uma relação percentual de 100 %.

RESULTADOS & CÁLCULOS

Cálculo dos resultados:

1. Registre a absorbância (OD) a 450 nm para cada poço (calibrador, controles e amostras dos pacientes).
2. Calcule a média dos valores em duplicata do calibrador e dos controles (se disponíveis).
3. Os resultados são expressos em termos da relação entre a absorbância das amostras e a absorbância (média) do calibrador.

Isotipos IgG/IgM combinados

$$\text{Relação \%} = \frac{\text{absorbância das amostras ou controles}}{\text{absorbância do calibrador}} \times 200$$

Isotipos IgG e IgM

$$\text{Relação \%} = \frac{\text{absorbância das amostras ou controles}}{\text{absorbância do calibrador}} \times 100$$

A maioria das leitoras de microplacas incluem programas para calcular os resultados como Relação %.

Nota: os resultados apresentados nas tabelas 7 e 8 são apenas exemplos. O calibrador e os controles devem ser utilizados em cada ensaio individual.

LIMITAÇÕES

1. Recomenda-se que a zona cinza e os resultados positivos obtidos com o mix de marcadores enzimáticos IgG/IgM sejam primeiramente discutidos com um clínico/neurologista requisitante antes da determinação adicional de isotipos com os marcadores enzimáticos IgG e IgM individuais.
2. As respostas autoimunes podem ser acompanhadas de reatividade cruzada com outros gangliosídeos testados. A reatividade cruzada tipicamente mostra uma alta variação interensaio e pode ser clinicamente irrelevante. Assim sendo, a interpretação dos resultados deve ser feita somente em conjunto com um especialista.
3. Devido à polirreatividade dos anticorpos autoimunes (ref. 6) e a diferenças na prevalência geográfica, os resultados do teste devem ser usados apenas para respaldar a interpretação clínica da neuropatia por um especialista, em combinação com o quadro clínico do paciente.
4. O BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA ainda não foi validado para amostras de plasmaferese.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

As limitações correspondentes, se aplicáveis, estão indicadas por números em sobrescrito.

	Isotipo: IgG/IgM Mix		
Corte e categorias / relações de títulos (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativo	Consulte as limitações ¹	Consulte as limitações ¹
GQ1b			
GM1			

Tabela 18

	Isotipo: IgG		
Corte e categorias / relações de títulos (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativo	Teste novamente num ponto de tempo posterior	Positivo
GQ1b			
GM1			

Tabela 19

	Isotipo: IgM		
Corte e categorias / relações de títulos (%)	<30	30-50	>50
GD1b	Negativo	Teste novamente num ponto de tempo posterior	Positivo
GQ1b			
GM1			

Tabela 20

INTERVALOS DE REFERÊNCIA E RELAÇÃO DE CUT-OFF

Em conjunto com as instruções mencionadas abaixo, um corte de 50% foi estabelecido. Valores <30 % foram claramente classificados como negativos. As categorias de título estabelecidas baseiam-se em n = 100 doadores de sangue¹ (homens e mulheres adultos com idade entre 18 e 70 anos) e n = 277 amostras patológicas². As amostras de soro foram analisadas para cada um dos 3 gangliosídeos (GM1, GD1b e GQ1b), de acordo com o procedimento do ensaio. Os resultados para doadores de sangue normais são mostrados na tabela 16.

Diretrizes de uso do ponto de corte e categorias/relações de títulos (%):

Interpretação clínica	Corte e categorias / relações de títulos (%)
Negativo	<30
Zona cinza	30-50
Ponto de corte	50
Positivo	>50-100
Fortemente positivo	>100

Tabela 6

¹) coletadas no centro de doação de sangue do Hospital Universitário da Basileia

²) recebidas do Friedrich-Baur-Institute da Universidade Ludwig-Maximilians de Munique; Departamento de Neurologia, Universidade da Basileia; Departamento de Neurologia, Universidade de Lyon.

CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO

Precisão intraensaio:

GD1b: 2.3-4.4 % CV; GQ1b: 2.6-5.2 % CV;

GM1: 1.4-5.7 % CV.

Para cada um dos três gangliosídeos revestidos na placa de microtitulação do teste GanglioCombi™ Light ELISA BÜHLMANN, dois soros antigangliosídeos positivos foram selecionados. As amostras de soro foram testadas em doze replicações em uma única corrida para cada marcador enzimático: Mix de IgG/IgM, IgG e IgM. A precisão intraensaio foi determinada na faixa de 2,6 a 4,5 % do CV para o mix de marcadores enzimáticos, 2,5 a 5,7 % do CV para o marcador enzimático IgG, e 1,4 a 5,2 % do CV para o marcador enzimático IgM. O estudo foi realizado com um lote de reagentes. Os resultados estão resumidos nas tabelas 9, 10 e 11.

Precisão interensaio:

GD1b: 8.0-13.2 % CV; GQ1b: 8.2-19.6 % CV;

GM1: 9.0-21.0 % CV.

Para cada um dos três gangliosídeos revestidos na placa de microtitulação do teste GanglioCombi™ Light ELISA BÜHLMANN, dois soros antigangliosídeos positivos foram selecionados. As amostras de soro foram testadas em replicações individuais em 20 corridas independentes diárias, uma para cada marcador enzimático: Mix de IgG/IgM, IgG e IgM. A precisão interensaio foi determinada na faixa de 8,2 a 15,2 % do CV para o mix de marcadores enzimáticos, 11,6 a 21,0 % do CV para o marcador enzimático IgG, e 8,0 a 15,6 % do CV para o marcador enzimático IgM. O estudo foi realizado com um lote de reagentes. Os resultados estão resumidos nas tabelas 12, 13 e 14.

Limite do branco (LoB): ≤6,1 % relação

O LoB foi estabelecido de acordo com a diretriz EP17-A do CLSI. Doze replicações do branco (tampão de incubação) foram testadas por gangliosídeo em uma única corrida para todos os três marcadores enzimáticos: Mix de IgG/IgM, IgG e IgM. O Limite do branco (LoB), expresso como a % da absorbância do calibrador, foi calculado como ≤6,1 % para o mix de marcadores enzimáticos IgG/ IgM, ≤3,1 % para o marcador enzimático IgG e ≤2,6 % para o marcador enzimático IgM. O valor mais alto do LoB obtido com três marcadores enzimáticos diferentes foi usado para se determinar o Limite do branco (LoB) geral. O estudo foi realizado com um lote de reagentes. O LoB foi avaliado usando-se análise paramétrica.

Limite de detecção (LoD): ≤8,1 % relação

O LoD foi estabelecido de acordo com a diretriz EP17-A do CLSI. Para cada um dos três gangliosídeos revestidos na placa de microtitulação, uma única amostra clínica, representando uma baixa concentração de anticorpos, foi medida em doze replicações em uma única corrida para cada um dos três marcadores enzimáticos: Mix de IgG/IgM, IgG e IgM. O Limite de detecção (LoD), expresso como a % da absorbância do calibrador, foi calculado como ≤8,1 % para o mix de marcadores enzimáticos IgG/ IgM, ≤6,3 % para o marcador enzimático IgG e ≤3,0 % para o marcador enzimático IgM. O valor mais alto do LoD obtido com três marcadores enzimáticos diferentes foi usado para se determinar o Limite de detecção (LoD) geral. O estudo foi realizado com um lote de reagentes. O LoD foi calculado usando-se análise paramétrica.

Sensibilidade funcional: ≤8,1 % relação

Um perfil de precisão foi gerado a partir dos resultados obtidos com o estudo de precisão interensaio descrito acima, usando-se duas amostras de soro positivas para cada um dos três gangliosídeos revestidos na placa de microtitulação e detectados com cada um dos marcadores enzimáticos: Mix de IgG/IgM, IgG e IgM. Os pontos dos dados foram ajustados usando-se um ajuste polinomial não linear com uma função cúbica.

Os intervalos de confiança de 95 % no ajuste foram determinados, e a sensibilidade funcional foi determinada como a intersecção do ajuste cúbico com o critério de aceitação de 20 % do CV. Os resultados estão resumidos na figura 2.

Linearidade

A faixa linear do GanglioCombi™ *Light* ELISA BÜHLMANN foi determinada de acordo com a diretriz de teste EP06-A do CLSI. Múltiplos soros com concentrações distribuídas em toda a faixa de medição do teste foram usados, permitindo a avaliação da maioria das combinações de gangliosídeos/marcadores enzimáticos. As amostras de soro foram diluídas de acordo com as instruções de uso. Em caso de amostras com resultado alto positivo, uma diluição maior foi aplicada (1:2000). Depois da diluição, séries de cada amostra foram preparadas em graduações de 10% usando o tampão de incubação como diluente. A linearidade foi definida como o intervalo no qual a diferença relativa entre o ajuste linear e, se significativo, o ajuste polinomial de maior ordem, ficou abaixo de 20%. Para valores $\leq 25\%$, uma diferença absoluta abaixo de 5% foi permitida. Uma faixa linear abrangendo e ultrapassando as categorias de títulos do GanglioCombi™ *Light* ELISA BÜHLMANN de <30% - negativo; 30-50% - zona cinza; 50-100% positivo, e >100% fortemente positivo, foi confirmada. Os resultados estão resumidos na tabela 15.

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi detectada com as seguintes substâncias até as concentrações indicadas: bilirrubina não conjugada (soro icterico): 40 mg/dL; bilirrubina conjugada (soro icterico): 60 mg/dL; hemoglobina (soro hemolisado): 400 mg/dL; hemolisado (sangue hemolisado): 400 mg/dL e triglicérides (Intralipid®): 3000 mg/dL.

APPENDIX I

TABLES AND FIGURES / TABELLEN UND ABBILDUNGEN / TABLEUX ET FIGURES / TABELLE E FIGURE / TABLAS Y FIGURAS / TABLAS E FIGURAS

Microtiter plate set-up

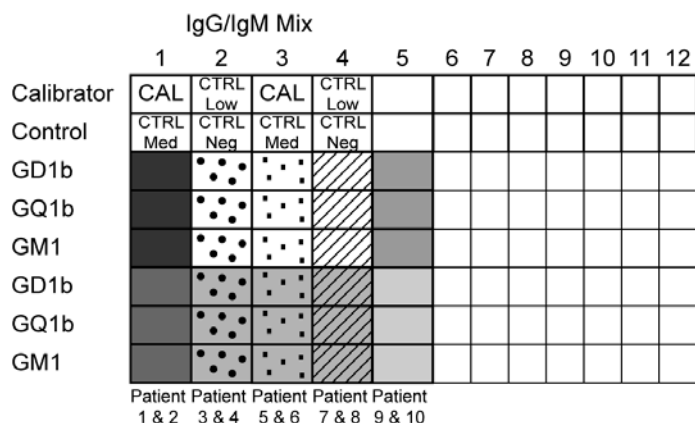


Figure 1A: IgG-Mix conjugate: 24 patients / kit (1 MP / kit)

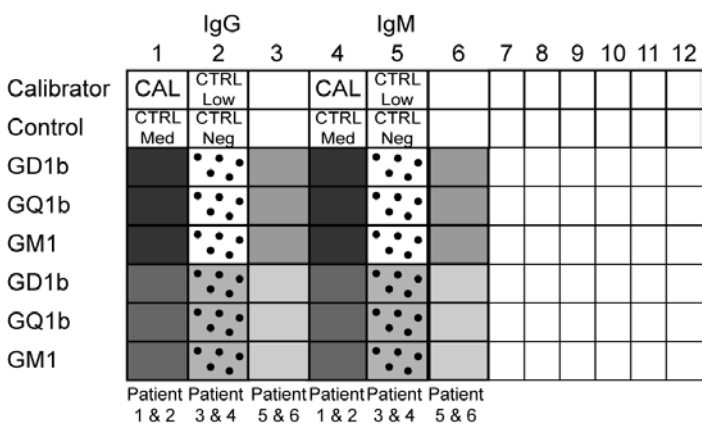


Figure 1B: IgG & IgM conjugate: 2 profiles / patient, 12 patients / Kit (1 MP/Kit)

Example of results

A IgG/IgM mix label

B-GCO-ELGM	Absorbance (OD450)	Ratio [%]	Result / Suggestion
Calibrator	1.415 1.445		
Calibrator Avg.	1.430	200	
Medium Control	0.498 0.482	69 67	
Med. Control Avg.	0.490	68	
Low Control	0.195 0.191	27 26	
Low Control Avg.	0.193	27	
Negative Control	0.090 0.100	12 14	
Neg. Control Avg.	0.095	13	
Sample 1 GM1	0.544	76	Positive
Sample 1 GD1b	0.745	104	Strongly positive
Sample 1 GQ1b	0.090	13	Negative

Table 7

B IgG & IgM labels

Enzyme labels	Absorbance (OD450)		Ratio [%]		Category	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM						
Calibrator	1.789 1.833	2.576 2.527				
Calibrator Avg.	1.836	2.551	100	100		
Medium Control	1.267 1.237	1.743 1.764	69 67	68 69		
Med. Control Avg.	1.252	1.753	68	69		
Low Control	0.567 0.584	0.938 0.942	30 32	37 37		
Low Control Avg.	0.571	0.940	31	37		
Neg. Control	0.061 0.051	0.098 0.095	3 3	4 4		
Neg. Control Avg.	0.056	0.097	3	4		
Sample 1 GM1	0.171	3.814	9	150	Neg.	Strong. Pos.
Sample 1 GD1b	1.021	0.354	56	14	Pos.	Neg.
Sample 1 GQ1b	0.378	0.208	21	8	Neg.	Neg.

Table 8

Intra-assay precision (within-run)

Enzyme label IgG/ IgM						
Gangliosides	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b	GM1	GM1
Sample	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	110	310	286	84	86	156
SD [Ratio]	4.0	8.0	9.2	3.8	2.4	5.0
CV [%]	3.6	2.6	3.2	4.5	2.8	3.2

Table 9

Enzyme label IgG						
Gangliosides	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b	GM1	GM1
Sample	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	139	111	89	222	59	82
SD [Ratio]	4.0	2.8	4.5	5.8	1.6	4.7
CV [%]	2.9	2.5	5.1	2.6	2.7	5.7

Table 10

Enzyme label IgM						
Gangliosides	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b	GM1	GM1
Sample	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	56	142	72	74	79	87
SD [Ratio]	2.5	3.3	3.8	2.6	1.8	1.2
CV [%]	4.4	2.3	5.2	3.5	2.3	1.4

Table 11

APPENDIX I

TABLES AND FIGURES / TABELLEN UND ABBILDUNGEN / TABLEUX ET FIGURES /
TABELLE E FIGURE / TABLAS Y FIGURAS / TABLAS E FIGURAS

Inter-assay precision (between-run)

Enzyme label IgG/ IgM						
Gangliosides	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b	GM1	GM1
Sample	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	96	306	92	262	74	184
SD [Ratio]	9.6	26.8	7.6	26.6	7.0	27.8
CV [%]	10.1	8.8	8.2	10.1	9.5	15.2

Table 12

Enzyme label IgG						
Gangliosides	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b	GM1	GM1
Sample	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	109	140	42	204	52	84
SD [Ratio]	14.2	18.5	8.3	23.6	6.4	17.6
CV [%]	13.0	13.2	19.6	11.6	12.4	21.0

Table 13

Enzyme label IgM						
Gangliosides	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b	GM1	GM1
Sample	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	154	46	171	63	102	63
SD [Ratio]	19.1	3.7	16.2	9.9	10.9	5.7
CV [%]	12.4	8.0	9.5	15.6	10.7	9.0

Table 14

Functional sensitivity

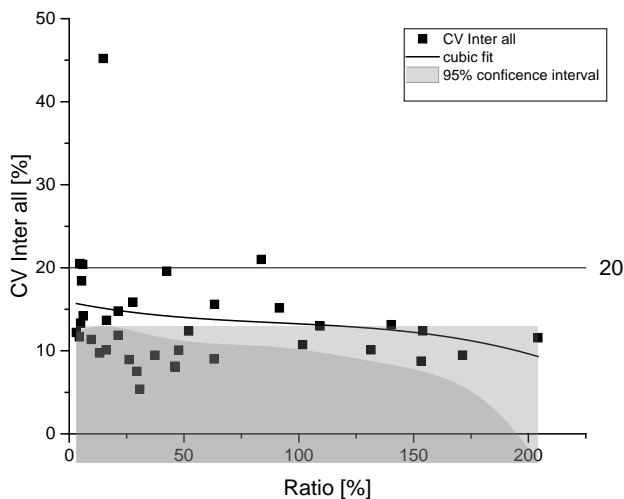


Figure 1

Linearity

Ganglio-side	Enzyme label	Serum	Range measured	Linear range
GD1b	IgG	581-SP	5-99	5-99
	IgM	72 BR	14-163	14-148
	Mix	581-SP	18-264 12-198	18-176 34-166
GQ1b	IgG	MG	18-228	18-228
GM1	IgG	SP69	7-94	7-94
		P II	9-181	17-175
		JJ	6-127	6-127
	IgM	SP69	10-93	21-79
		SM1	14-148	26-114
			9-138	9-89
	Mix	P II	16-302	16-302
		SP69	14-218	22-178

Table 15

Normal values

BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA: Anti-ganglioside antibodies (%)									
Enzyme label isotype	IgG			IgM			IgG/ IgM		
	GD1b	GQ1b	GM1	GD1b	GQ1b	GM1	GD1b	GQ1b	GM1
Negative	92.0	98.0	96.0	99.0	99.0	95.0	97.0	100	96.0
Greyzone	6.0	1.0	2.0	0.0	1.0	3.0	3.0	0.0	3.0
Positive	2.0	1.0	2.0	1.0	0.0	2.0	0.0	0.0	1.0
Strongly positive	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

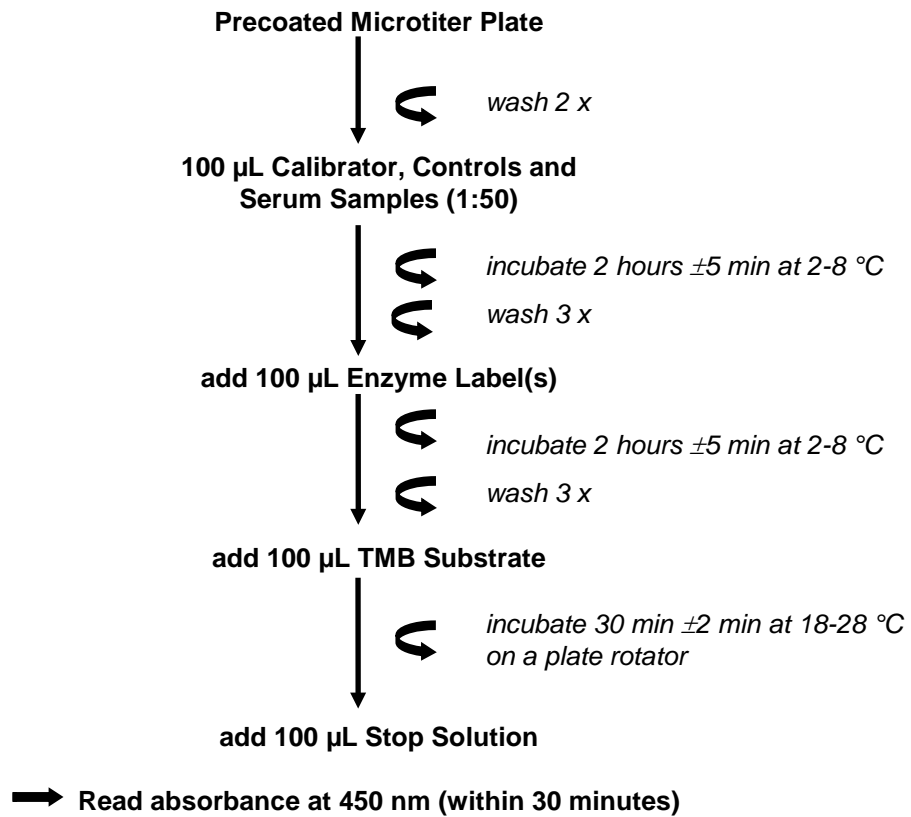
Table 16:

Distribution frequency of individual anti-ganglioside auto-antibodies (%) in normal blood donors (n=100) detected with BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA assay, classified into titre categories.

REFERENCES / REFERENZEN / REFERENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS

1. Willison HJ and Yuki N: *Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies*. Brain 125, 2591-2625 (2002)
2. Latov N: *Diagnosis and treatment of chronic acquired demyelinating polyneuropathies*. Nature Reviews Neurology 10, 435-446 (2014)
3. Burns TM and Mauermann ML: *The Evaluation of Polyneuropathies*. Neurology Clinical Practice 76, 6-13 (2011)
4. Stork ACJ et al. *Prevalence, specificity and functionality of anti-ganglioside antibodies in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy*. Journal of Neuroimmunology 268, 89-94 (2014)
5. Humbel RL and Schmit P: *Anticorps antigangliosides et neuropathies peripheriques*. Rev Med Liege 51, 368-375 (1996)
6. Bourque P R et al. *Autoimmune peripheral neuropathies*. Clin Chim Acta 449, 37-42 (2015)
7. Delmont E and Willison H: *Diagnostic Utility of Auto Antibodies in Inflammatory Nerve Disorders*; J of Neuromuscular Diseases 2, 107-112 (2015)

BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA





TIME TO RESULT: 4.5 HOURS

APPENDIX IV

NOTES / NOTIZEN / NOTES / NOTE / NOTAS

APPENDIX V

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad Data de expiração
REF	Catalogue number Bestellnummer Référéce du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo Código de encomenda
LOT	Batch code Lot-Bezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote Código lote
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Producto sánitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperature Límite de temperatura
MP	Microtiterplate Mikrotiterplatte Plaque de microtitration Micropiastra Placa de microtitulación Placa de microtitulação
BUF WASH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Waschpufferkonzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage Tampón de lavado concentrado (x10) Tampón de lavado concentrado (x10) Concentrado de tampão de lavagem (x10)
BUF INC	Incubation Buffer Inkubationspuffer Tampon d'incubation Tampón de incubación Tampão de incubação

Symbol	Explanation
CONTROL -	Negative Control Negativkontrolle Contrôle négatif Control negativo Control negativo Controle negativo
CONTROL L	Low Control Kontrolle tief Contrôle faible Control bajo Control bajo Control baixo
CONTROL M	Medium Control Kontrolle medium Contrôle moyen Control medio Control medio Control medio
CAL	Calibrator Kalibrator Calibreur Calibratore Calibrador Calibrador
EL IgG	Enzyme Label IgG Enzymmarker-IgG Marqueur enzymatique IgG Marcatore enzimatico IgG Marcador enzimático IgG Marcador enzimático de IgG
EL IgM	Enzyme Label IgM Enzymmarker-IgM Marqueur enzymatique IgM Marcatore enzimatico IgM Marcador enzimático IgM Marcador enzimático de IgM
EL MIX	Enzyme Label IgG/IgM Mix Enzymmarker- IgG/IgM Mix Marqueur enzymatique IgG/IgM mix Marcatore enzimatico Mix Mezcla de Marcador enzimático Marcador enzimático combinados
SUBS TMB	TMB Substrate TMB Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato TMB Substrato TMB
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de interrupción Solução stop

