BÜHLMANN
GanglioCombi® MAG ELISA

avec les marqueurs enzymatiques Mix IgG/IgM, IgG et IgM

Détection d'anticorps anti-ganglioside et anti-MAG par ELISA

(HNK-1 [« MAG »], GM1, GT1a, GD1a, GD1b et GQ1b)

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*

EK-GCM 2 x 96 tests

Date de publication : 2023-08-17
Version A1

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

FRANCAIS

UTILISATION PRÉVUE

Le test BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA est un test de diagnostic *in vitro* destiné à la détermination semi-quantitative des anticorps IgG et/ou IgM dirigés contre des antigènes/épitopes neuronaux sélectionnés dans des échantillons de sérum. Les résultats du dosage peuvent être utilisés pour confirmer le diagnostic de neuropathies périphériques auto-immunes en conjonction avec d'autres résultats cliniques et analyses de laboratoire.
Pour utilisation en laboratoire uniquement.

APPLICATION PRÉVUE

Les trois marqueurs enzymatiques fournis dans le kit permettent trois algorithmes de test différents :

1. L'utilisation du mélange de conjugués IgG/IgM (appelé Mix ci-après) permet de dépister la présence d'anticorps anti-neuronaux suggérant une neuropathie auto-immune.
2. L'utilisation des conjugués individuels IgG et/ou IgM permet la détermination de l'isotype des anticorps.
3. Pour les analyses de laboratoire, le dépistage initial des échantillons en utilisant le Mix (option 1) peut être suivi, pour les échantillons positifs, de l'identification de l'isotype en utilisant les conjugués IgG et IgM individuels (option 2), si nécessaire.

PRINCIPE DU DOSAGE

Le test BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA de permet la mesure des anticorps dirigés contre les gangliosides et la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) dans le sérum. La microplaque est revêtue des gangliosides : GM1, GT1a, GD1a, GD1b, GQ1b et l'épitope de synthèse HNK-1 de la glycoprotéine MAG (réf. 1).
Les sérums de patient, les contrôles et le calibrateur sont ajoutés aux puits de la microplaque. Après 2 heures d'incubation à 2-8 °C et des étapes de lavage, les anticorps de détection (anti-IgG/IgM, anti-IgG, anti-IgM) conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) détectent les anticorps anti-ganglioside et/ou anti-MAG liés aux gangliosides ou à HNK-1 coatés sur la plaque. Après 2 nouvelles heures d'incubation et des étapes de lavage supplémentaires, le substrat chromogène de la HRP, la tétraméthylbenzidine (TMB), est ajouté. La solution prend une coloration bleue qui vire au jaune après l'ajout de la solution stop. L'absorption est mesurée à 450 nm.
L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans un échantillon donné. Les titres d'anticorps sont exprimés en rapports au calibrateur en % et peuvent être assignés à des catégories de titre (négatif, zone grise, positif).

RÉACTIFS FOURNIS ET PRÉPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque coatée (gangliosides et HNK-1)	2 x12 x 8 barrettes de 8 puits avec support	B-GCM-MP	Prêt à l'emploi
Film adhésif	6 exemplaires		
Tampon de lavage concentré (10x) avec conservateurs	2 flacons x 100 mL	B-GCO-WB	A diluer avec 900 mL d'eau déionisée
Tampon d'incubation avec conservateurs	1 flacon x 100 mL	B-GCO-IB	Prêt à l'emploi
Calibrateur lyophilisés avec conservateurs	1 flacon	B-GCO-CA	Ajouter 1,5 mL de tampon d'incubation
Contrôles négatif, bas, moyen [1] lyophilisés avec conservateurs	3 flacons	B-GCO-CONSET	Ajouter 1,5 mL de tampon d'incubation
Marqueur enzymatique Mix IgG/IgM anticorps anti-IgG et IgM humain conjugué à la HRP dans une tampon de matrice contenant des conservateurs	2 flacons x 11 mL	B-GCO-ELGM	Prêt à l'emploi
Marqueur enzymatique IgG anticorps anti-IgG humain conjugué à la HRP dans une tampon de matrice contenant des conservateurs	1 flacon x 11 mL	B-GCO-ELG	Prêt à l'emploi
Marqueur enzymatique IgM anticorps anti-IgM humain conjugué à la HRP dans une tampon de matrice contenant des conservateurs	1 flacon x 11 mL	B-GCO-ELM	Prêt à l'emploi
Substrat TMB TMB dans un tampon citrate	2 flacons x 11 mL	B-TMB	Prêt à l'emploi
Solution stop acide sulfurique 0,25 M	2 flacons x 11 mL	B-STS	Prêt à l'emploi **Agent corrosif**

Tableau 1

[1] Les contrôles contiennent des niveaux d'anticorps anti-GM1 spécifiques à chaque lot. Se référer à la fiche additionnelle de CQ pour connaître les valeurs de DO moyennes réelles et le rapport en %.

CONSERVATION ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs scellés / non ouverts	
Stocker à 2-8 °C. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption figurant sur les étiquettes.	
Réactifs ouverts / reconstitués	
Microplaque	Replacer immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette contenant les sachets de dessiccateur puis refermer soigneusement le joint d'étanchéité. Stocker jusqu'à 6 mois à 2-8 °C.
Tampon de lavage dilué	Stocker jusqu'à 6 mois à 2-8 °C.
Tampon d'incubation	
Marqueurs enzymatiques	
Substrat TMB	
Calibrateur	
Contrôles	
Solution stop	Stocker jusqu'à 6 mois à 18-28 °C.

Tableau 2

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision à pointes jetables : pipettes de 10 µL, 20 µL, 100 µL et 1000 µL
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène pour la préparation des dilutions d'échantillons
- Éprouvette graduée de 1000 mL pour la dilution du tampon de lavage
- Laveur de plaques de Microplaque
- Papier absorbant
- Agitateur de Microplaque
- Lecteur Microplaque pour la mesure de l'absorbance à 450 nm

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Précautions de sécurité

- Le calibrateur et les contrôles de ce kit contiennent des composants d'origine humaine. Bien qu'ils aient été testés négatifs au VHB, au VHC et au VIH1/2, les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux et conformément aux Bonnes pratiques de laboratoire (BPL) en respectant les précautions appropriées.
- Ce kit contient des composants classés conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 :
  - La solution stop contient de l'acide sulfurique (conc. 2,5-5 %) ; ainsi, les réactifs peuvent provoquer une irritation cutanée (H315), une irritation oculaire grave (H319), et peuvent être corrosifs pour les métaux. (H290).
  - Le calibrateur, les contrôles et les marqueurs enzymatiques contiennent du chlorhydrate de 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (conc. ≥ 0,0015 %), ainsi les réactifs peuvent provoquer des réactions allergiques cutanées (H317).
  - Le tampon d'incubation et le tampon de lavage contiennent du sulfate de gentamicine, ainsi, les réactifs peuvent entraîner une réaction allergique cutanée (H317).
- Éviter tout contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact accidentel, rincer immédiatement à grande eau pour éviter tout risque d'irritation/ brûlures.
- Traiter les réactifs et les produits chimiques comme des déchets dangereux conformément aux directives ou aux réglementations de sécurité nationales relatives aux substances présentant un risque biologique.

Précautions techniques

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Les performances du test seront dégradées par une altération ou une mauvaise dilution des réactifs, ou si ces derniers sont stockés dans des conditions ne respectant pas les instructions d'utilisation ci-détaillées.

Procédure ELISA

Température des réactifs

- Préparer les réactifs avant de démarrer la procédure de dosage. Étapes 3-9 : Les réactifs utilisés dans les étapes 3 à 9 doivent être froids (2-8 °C) et maintenus à basse température lors du pipetage et du lavage. Recommandation : préparer le tampon de lavage le jour qui précède la réalisation du dosage et le placer au réfrigérateur pendant une nuit.
- Réaliser toutes les étapes de lavage avec du tampon de lavage froid (2-8 ˚C).
- Equilibrer le substrat TMB et la solution stop à température ambiante (18-28 °C) au début de la procédure de dosage.

Étapes de lavage

- Les étapes de lavage 3, 6 et 9 sont cruciales pour éliminer les résidus résultant du processus de production et/ou les éventuels anticorps potentiellement non liés dans les puits.
- Un laveur automatique fonctionnant en « mode plaque » est fortement recommandé : chaque étape du processus (distribution/aspiration) est ainsi mise en œuvre sur la totalité des barrettes, séquentiellement, avant que l'instrument ne passe au cycle de lavage suivant.
- Vérifier que tous les puits sont complètement vides après le dernier cycle de lavage.

Incubation du substrat

- Étape 11 : agiter les microplaques pendant l'incubation avec le substrat. En fonction du modèle d'agitateur de plaque, une vitesse de 400 à 600 rpm est recommandée. La solution doit bouger dans les puits sans déborder ni se renverser.

Contenu du kit

- Chaque composant ne doit pas être utilisé après la date de péremption imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger les réactifs issus de lots différents.
- S'assurer impérativement qu'aucune contamination entre réactifs, échantillons ou puits ne se produit.
- Les micropuits ne peuvent pas être réutilisés.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La procédure exige respectivement < 0,1 mL de sang ou < 50 µL de sérum.

Prélever le sang dans des tubes pour ponction veineuse simples sans aucun additif et éviter toute hémolyse. Préparer le sérum conformément aux instructions du fabricant. Décanter le sérum.

Les échantillons de sérum peuvent être conservés à 2-8 °C jusqu'à huit semaines, à 28 °C pendant jusqu'à une semaine et à ≤ -20 °C pendant 16 semaines. Les échantillons congelés doivent être décongelés et mélangés soigneusement par rotation ou retournement à faible vitesse avant utilisation.
Il est recommandé de préparer des aliquots d'échantillons de sérum avant la congélation afin d'éviter des cycles répétés de congélation/décongélation.

PROCEDURE DE DOSAGE

Deux options sont possibles :

(1) La détection du mélange d'isotypes (IgG et IgM) : ajouter le Mix de marqueurs enzymatiques à l'étape 7

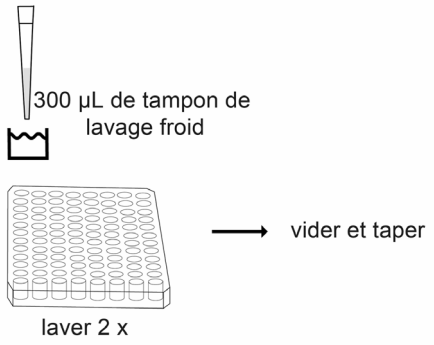
(2) La détection des isotypes IgG ou IgM : ajouter soit le marqueur enzymatique IgG, soit le marqueur enzymatique IgM à l'étape 7

Remarque : équilibrer la solution de substrat TMB à température ambiante (18-28 °C).

1. Diluer les échantillons au 1/50e avec du tampon d'incubation. Utiliser p. ex. 20 µL de sérum + 980 µL de tampon d'incubation froid (2-8 °C). Mélanger complètement au vortex et laisser les échantillons dilués, ainsi que le calibrateur et les contrôles reconstitués, à 2-8 °C pendant 30 minutes avant pipetage (consulter les étapes 4a et b).
2. Préparer un support de plaque avec un nombre de barrettes suffisant pour tester le nombre requis de calibrateurs, de contrôles et d'échantillons. Retirer les barrettes en surplus du support et les replacer immédiatement dans la pochette prévue à cet effet contenant les sachets de dessiccateur. Conserver au réfrigérateur.

Remarque : utiliser des réactifs froids dans les étapes 3 à 9.

3. Laver les puits deux fois avec au minimum 300 µL de tampon de lavage froid (2-8 °C) par puits. Vider les puits et taper fermement la plaque sur le papier absorbant pour éliminer complètement le liquide restant.



Remarque : continuer sans interruption avec l'étape suivante.

4a. Pipeter 100 µL de calibrateur dans le puits A1 (consulter la figure 1A pour l'option 1 ou la figure 1B pour l'option 2).

4b. Pipeter 100 µL de contrôle moyen dans le puits B1, de contrôle bas dans le puits A2 et de contrôle négatif dans le puits B2 (consulter la figure 1A ou 1B).

Remarque pour l'option 1 : plus de trois barrettes sont utilisées par analyse, le calibrateur et les contrôles peuvent être testés en double (voir la figure 1A).

Remarque pour l'option 2 : Le calibrateur et les contrôles doivent être analysés séparément pour les isotypes IgG et IgM (voir la figure 1B).

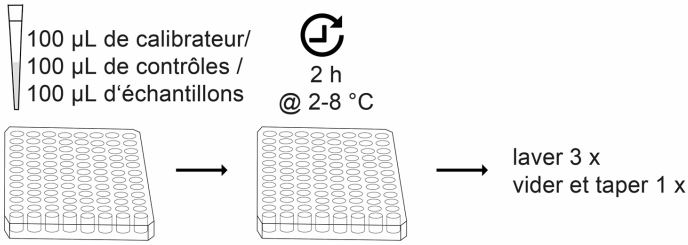
4c. Pipeter 100 µL d'échantillon 1 dilué dans les puits C1-H1 (consulter figure 1A ou 1B).

4d. Pipeter 100 µL d'échantillon 2 dilué dans les puits C2-H2 (consulter figure 1A ou 1B).

4e. Pipeter 100 µL des échantillons 3 à 24 dilués (pour l'option 1) ou 3 à 12 dilués (pour l'option 2) dans les puits suivants (consulter la figure 1A ou 1B).

Remarque pour l'option 2 : répéter le pipetage des échantillons 1 à 12 dans le même ordre dans les puits restants pour le tester le second isotype.

5. Recouvrir la plaque d'un film adhésif et incuber pendant 2 heures (± 5 min) à 2-8 °C (ne pas secouer la plaque).
6. Retirer le film adhésif de la plaque. Vider les puits et les laver trois fois avec au minimum 300 µL de tampon de lavage froid (2-8 °C) par puits. Vider les puits et taper fermement la plaque sur le papier absorbant pour éliminer complètement le tampon de lavage.



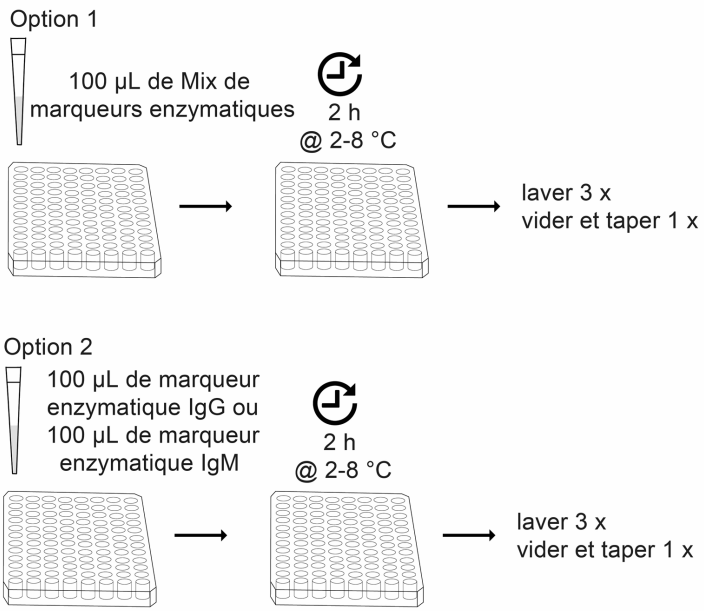
Pour l'option 1 : Détection du Mix d'isotypes

7. Ajouter 100 µL de Mix dans chaque puits.

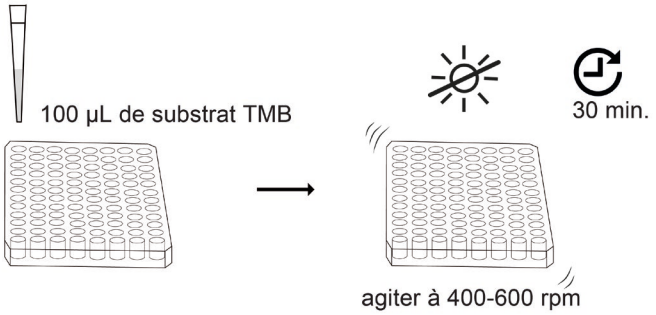
Pour l'option 2 : Détection des isotypes IgG ou IgM

7'. Ajouter 100 µL du marqueur enzymatique IgG ou du marqueur enzymatique IgM aux puits correspondants (consulter la figure 1B).

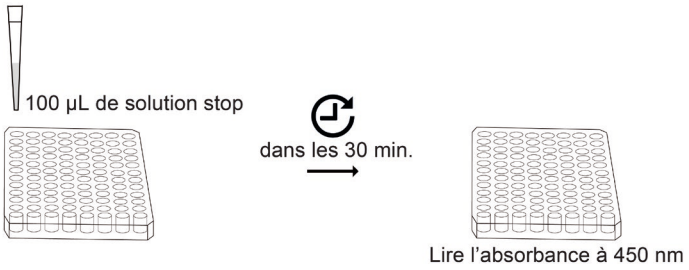
8. Recouvrir la plaque d'un film adhésif et incuber pendant 2 heures (± 5 min) à 2-8 °C (ne pas secouer la plaque).
9. Retirer le film adhésif de la plaque. Vider les puits et les laver trois fois avec au minimum 300 µL de tampon de lavage froid (2-8 °C) par puits. Vider les puits et taper fermement la plaque sur le papier absorbant.



10. Ajouter 100 µL de solution de substrat TMB (équilibré à température ambiante) dans chaque puits.
11. Recouvrir la plaque d'un film adhésif, protéger la plaque de la lumière et incuber sur un agitateur de plaque réglé à 400-600 rpm, à 18-28 °C pendant 30 ± 2 minutes.



12. Ajouter 100 µL de solution stop dans chaque puits. Retirer les bulles d'air avec une pointe de pipette. Passer à l'étape 13 dans les 30 minutes qui suivent.
13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.



CONTRÔLE DE QUALITÉ

Une compréhension approfondie de ces instructions d'utilisation est nécessaire pour une utilisation réussie du produit. Des résultats fiables ne seront obtenus qu'en utilisant des techniques de laboratoire précises et en suivant scrupuleusement ces instructions d'utilisation.
Le test BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA de inclut trois contrôles : négatif, bas et moyen. Les valeurs des contrôles sont comprises dans des gammes de valeurs (% Ratio) qui sont indiquées sur la fiche de contrôle qualité fournie dans chaque coffret. Les mesures des contrôles doivent être comprises dans les gammes de valeurs indiquées pour obtenir des résultats valides.
En plus des contrôles fournis dans le coffret, une utilisation de pools de sérum comme contrôle de qualité interne est recommandée.
Une valeur minimale de DO_{450nm} de 1,2 est recommandée pour le calibrateur.
Les caractéristiques de performances doivent être comprises dans les limites établies. Si les performances du dosage ne répondent pas aux limites établies et que la répétition a exclu les erreurs liées aux manipulations techniques, vérifier les points suivants : i) contrôle de la température (réactifs utilisés dans les étapes 3 à 9 conservés à 2-8 °C) ii) précision des thermomètres, des dispositifs de pipetage et de chronométrage ; iii) paramètres du lecteur ELISA ; iv) dates de péremption des réactifs ; v) conditions de stockage et d'incubation ; vi) couleur de la solution de substrat TMB (doit être incolore) ; vii) pureté de l'eau ; viii) méthodes d'aspiration et de lavage.

STANDARDISATION ET TRAÇABILITE METROLOGIQUE

Il n'existe pas de substances de référence ou de procédures de mesure de référence reconnues au niveau national ou international pour les anticorps anti-ganglioside ou anti-MAG dans les échantillons de sérum. Le test BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA de est normalisé par rapport à un matériel de référence établi en interne. Les valeurs du calibrateur sont attribuées selon un protocole de transfert de valeur (réf. 2) pour garantir la traçabilité métrologique, et sont indiquées en unités arbitraires de « ratio en % ».
L'intervalle de confiance à 95% de l'incertitude combinée des calibrateurs a été déterminé comme étant de 29,3% pour les anticorps IgG et de 37,6% pour les anticorps IgM.

CALCUL DES RÉSULTATS DU TEST

1. Mesurer l'absorbance (DO) à 450 nm pour chaque puits (calibrateur, contrôles et échantillons).
2. Si plusieurs mesures de calibrateur et de contrôles ont été effectuées, calculer la moyenne des valeurs.

Les résultats sont exprimés sous la forme du ratio de l'absorbance des échantillons et de l'absorbance (moyennée) du calibrateur.

Mix d'isotypes

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

Isotypes IgG et IgM

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

Des programmes de calcul des résultats en Ratio en % sont disponibles sur la plupart des lecteurs de microplaques.

Remarque : Les résultats présentés dans les tableaux 7 et 8 sont des exemples qui sont uniquement fournis à titre de démonstration.

LIMITES

- Les résultats de ratio en % élevés (> 100%) pour des gangliosides individuels peuvent résulter d'une réactivité croisée avec d'autres gangliosides dans le même échantillon. La réactivité croisée présente typiquement une variation inter-dosage élevée. L'interprétation des résultats doit donc impérativement être réalisée en présence d'un expert / spécialiste.
- Du fait de la polyréactivité des anticorps auto-immuns et des différences de prévalence géographique, les résultats des dosages doivent uniquement être utilisés pour étayer l'interprétation clinique de la neuropathie par un expert / spécialiste en combinaison avec le tableau clinique du patient (réf. 3).
- Ce test n'a pas été validé pour la plasmaphérèse.
- Les immunoglobulines intraveineuses (IVIg) peuvent affecter les résultats du test.

INTERVALLES DE RÉFÉRENCE ET VALEUR SEUIL

L'intervalle de référence du test BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA de a été établi selon la ligne directrice C28-A3 du CLSI avec 120 échantillons sériques d'individus s'auto-déclarant sains. La fréquence de distribution des anticorps anti-ganglioside et anti-MAG chez les donneurs sains de sang sains a été classée dans les catégories de titre : négatif (rapport < 30%), zone grise (rapport 30-50%) et positif (rapport > 50%). Les résultats sont résumés dans le tableau 9. La valeur de seuil positivité correspond à un ratio de 50%.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Antigène	Mix IgG/IgM		
	Valeurs (rapport en %)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Négatif	Consulter l'annotation */**	Consulter l'annotation */**
GM1		Retester ultérieurement	Positif
GT1a			
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

Tableau 3

Antigène	IgG		
	Valeurs (rapport en %)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Négatif	Consulter l'annotation *	Consulter l'annotation *
GM1		Retester ultérieurement	Positif
GT1a			
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

Tableau 4

Antigène	IgM		
	Valeurs (rapport en %)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Négatif	Consulter l'annotation **	Positif (consulter l'annotation **)
GM1		Retester ultérieurement	Positif
GT1a			
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

Tableau 5

Les résultats des tests doivent être interprétés en conjonction avec les informations issues de l'évaluation clinique du patient et des autres procédures diagnostiques.
* La neuropathie à MAG est couramment associée à la présence d'anticorps anti-MAG de l'isotype IgM (réf. 4).
** Les résultats compris entre 30 et 50 % (zone grise) ou > 50 % (positifs) pour HNK-1 obtenus avec le Mix ou le marqueur enzymatique IgM peuvent être retestés avec le coffret anti-MAG Antibodies ELISA (EK-MAG).

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Comparaison des méthodes

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA vs anti-MAG Antibodies ELISA

L'étude de comparaison des méthodes a été réalisée selon les lignes directrices EP09-A3 et EP12-A2 du CLSI. Cent vingt-deux (122) échantillons ont été mesurés en utilisant 2 lots de kits BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA et 2 lots de tests anti-MAG Antibodies ELISA. La concordance diagnostique (kappa), le pourcentage de concordance négatif et le pourcentage de concordance positif ont été déterminés. Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Précision intra-laboratoire

Pour les anti-gangliosides : 5,7 - 13,2% CV
Pour les anti-MAG : 14,4 - 36,5% CV

La précision intra-laboratoire a été établie selon la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle d'étude standardisé de 20 jours x 2 séries x 2 réplicats. Trois (3) pools d'échantillons de sérums de patients ont été testés. Les résultats sont résumés dans le tableau 11.

Reproductibilité

Pour les anti-gangliosides : 7,7 - 19,1% CV
Pour les anti-MAG : 23,5 - 33,2% CV

La reproductibilité a été établie selon la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle d'étude 3 instruments/lots/opérateurs x 5 jours x 5 réplicats. Trois (3) pools d'échantillons de sérums de patients ont été testés. Les résultats sont résumés dans le tableau 12.

Limite de blanc (LoB) ≤ Limite de détection (LoD) : ≤ ratio de 30%

La LoB et la LoD ont été établies selon la ligne directrice EP17-A2 du CLSI en utilisant une analyse non paramétrique. Les résultats sont résumés dans le tableau 13.

« Effet crochet » à dose élevée

Aucune limite liée à un effet crochet à dose élevée sur la gamme de mesure n'a été observée.

Réactivité croisée

Aucune réactivité croisée systématique n'a été observée pour les échantillons provenant de patients atteints de différentes maladies auto-immunes (tableau 14) et de patients souffrant d'autres troubles neurologiques (tableau 15).

PERFORMANCES CLINIQUES

Les performances cliniques ont été évaluées grâce à une analyse récapitulative de la littérature scientifique revue par des pairs. Six (6) études se sont intéressées aux performances cliniques du test BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA dans le diagnostic des neuropathies périphériques auto-immunes (réf. 5-10). Les résultats de l'analyse et les détails de l'étude sont fournis dans le tableau 6 et le tableau 16, respectivement.

N de neuropathies périphériques	201 (102 GBS pédiatriques, 14 CIDP, 44 GBS, 41 neuropathies anti-MAG)
N contrôles	493 (104 CM, 254 CN, 135 CS)
Sensibilité (IC à 95 %)	68,1 % (39,6 – 87,5 %)
Spécificité (IC à 95 %)	88,0 % (72,3 – 95,3 %)
ROC AUC	0,85

Tableau 6

GBS, syndrome de Guillain-Barré ; CM, contrôle maladie non neurologique ; CN, contrôle neurologique ; CS, contrôle sain ; CIDP, polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique ; IC, intervalle de confiance ; ROC AUC, aire sous la courbe de la fonction d'efficacité du récepteur

SUBSTANCES INTERFÉRENTES

La sensibilité du dosage aux produits pharmaceutiques oraux et injectables ainsi qu'aux substances endogènes a été évaluée selon suivant la ligne directrice EP07-A3 du CLSI. Une déviation dans les résultats ≥ ratio de ± 20% était considérée comme une interférence.

Aucune interférence n'a été détectée avec les substances suivantes jusqu'à la concentration indiquée : immunoglobuline intraveineuse (20 mg/mL), rituximab (3 mg/mL), cladribine (273 ng/mL), interféron alpha-2a (49,5 ng/mL), gabapentine (26,7 µg/mL), ibuprofène (0,22 mg/mL), chlorambucil (1,96 µg/mL), prednisone (99 ng/mL), prednisolone (1,2 µg/mL), facteur rhumatoïde (2340 UI/mL), hémoglobine (10 mg/mL), hémolysat (10 mg/mL), triglycéride (15 mg/mL), bilirubine conjuguée (20 µg/mL), bilirubine non conjuguée (150 µg/mL).

TABLEAUX ET FIGURES

Configuration de la microplaque : Mix de marqueurs IgG/IgM

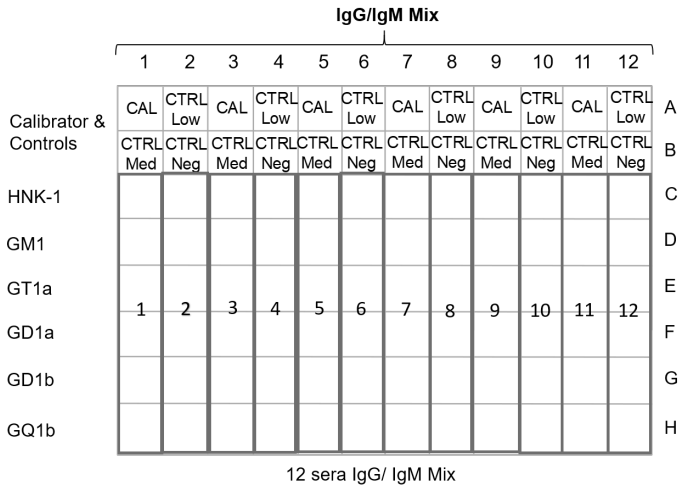


Figure 1A : ≤ 24 sérums / kit (2 MP / kit)

Configuration de la microplaque : Marqueurs IgG et IgM

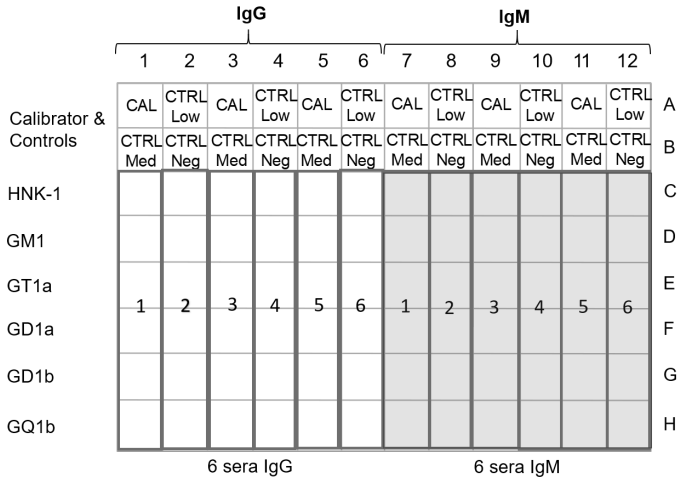


Figure 1B : 2 profils / sérum, ≤ 12 sérums / kit (2 MP / kit)

Example de résultats

A Mix de marqueurs IgG/IgM

B-GCO-ELGM	Absorbance (DO450)	Ratio [%]
Calibrateur Moy. calibrateurs	2,179 2,477 2,328	100
Contrôle moyen Moy. contrôles moyens	1,737 1,891 1,814	78
Contrôle bas Moy. contrôles bas	0,662 0,460 0,561	24
Contrôle négatif Moy. contrôles négatifs	0,044 0,046 0,045	2
Échantillon 1 HNK-1	0,234	10
Échantillon 1 GM1	0,543	23
Échantillon 1 GT1a	1,976	85
Échantillon 1 GD1a	0,621	27
Échantillon 1 GD1b	0,734	32
Échantillon 1 GQ1b	2,573	111

Tableau 7

B Marqueurs IgG et IgM

Marqueur enzymatique	Absorbance (DO450)		Ratio [%]	
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM	IgG	IgM	IgG	IgM
Calibrateur Moy. calibrateurs	2,488 2,446 2,467	2,411 2,201 2,306	100	100
Contrôle moyen Moy. contrôles moyens	1,879 1,987 1,933	1,734 1,818 1,776	78	77
Contrôle bas Moy. contrôles bas	0,452 0,716 0,584	0,501 0,609 0,555	24	24
Contrôle négatif Moy. contrôles négatifs	0,045 0,037 0,041	0,048 0,042 0,045	2	2
Échantillon 1 HNK-1	0,423	0,621	17	27
Échantillon 1 GM1	2,001	2,102	81	91
Échantillon 1 GT1a	0,521	0,237	21	10
Échantillon 1 GD1a	1,984	0,821	80	36
Échantillon 1 GD1b	0,473	1,923	19	83
Échantillon 1 GQ1b	0,094	0,911	4	40

Tableau 8

TABLEAUX ET FIGURES

Intervalle de référence

Analyte	% de donneurs de sang normaux dans les catégories			Limite de référence (IC 90 %)
	Rapport < 30 %	Rapport 30 - 50 %	Rapport > 50 %	
IgG anti-MAG	96,7	2,5	0,8	25 (15,7 – 39,5)
IgM anti-MAG	99,2	0,8	0,0	20 (18.6 – 28,4)
IgGM anti-MAG	86,7	10,0	3,3	44 (34,8 – 52,9)
IgG anti-GM1	99,2	0,8	0,0	16 (13,0 – 29,8)
IgM anti-GM1	95,8	3,3	0,8	24 (14,3 – 40,3)
IgGM anti-GM1	95,0	4,2	0,8	34 (23,3 – 49,5)
IgG anti-GT1a	90,0	6,7	3,3	44 (35,9 – 113,1)
IgM anti-GT1a	97,5	2,5	0,0	16 (10,3 – 31,8)
IgGM anti-GT1a	85,0	10,0	5,0	50 (42,4 – 140,3)
IgG anti-GD1a	91,7	5,0	3,3	42 (26,2 – 108,2)
IgM anti-GD1a	100,0	0,0	0,0	8 (6,6 – 12,4)[F] 18 (6,6 – 24,3)[M]
IgGM anti-GD1a	88,3	5,8	5,8	53 (35,0 – 118,7)
IgG anti-GD1b	97,5	1,7	0,8	21 (14,5 – 33,0)
IgM anti-GD1b	99,2	0,0	0,8	15 (6,3 – 15,5)[F] 9 (6,4 – 54,7)[M]
IgGM anti-GD1b	95,0	3,3	1,7	30 (22,3 – 71,6)
IgG anti-GQ1b	97,5	2,5	0,0	24 (14,6 – 33,4)
IgM anti-GQ1b	99,2	0,8	0,0	8 (6,2 – 17,8)
IgGM anti-GQ1b	95,0	4,2	0,8	31 (23,1 – 46,7)

F sous-groupe femmes. *M* sous-groupe hommes

Tableau 9

Comparaison des méthodes anticorps anti-MAG

Description	N	Concordance kappa		NPA		PPA	
		Valeur	95 % IC	Valeur	95 % IC	Valeur	95 % IC
EK-GCM IgM p/r EK-MAG	122	0,88	0,80 - 0,97	100,0%	94,6% - 100,0%	87,5%	75,9%-94,8%
EK-GCM Mix IgG/IgM p/r EK-MAG	122	0,87	0,78 - 0,96	97,0%	89,5% - 99,6%	89,3%	78,1%-96,0%

Tableau 10

NPA : % concordance négatif
PPA : % concorfance positif
IC : Intervalle de confiance

Précision intra-laboratoire

Description des échantillons			Précision intra-laboratoire			
Analyte	Marqueur enzymatique (isotype)	Catégorie attendue [Rapport en %]	N	Moyenne [Rapport en %]	Écart-type [Rapport en %]	CV [%]
Ac anti-GM1	IgM	30-50	80	48	3,5	7,2
		>50	80	91	6,2	6,8
	IgG	30-50	80	40	5,1	12,9
		>50	80	106	13,1	12,4
Ac anti-GQ1b	IgM	30-50	80	45	2,6	5,7
		>50	80	85	6,7	7,8
	IgG	30-50	80	43	5,7	13,2
		>50	80	80	6,9	8,6
Ac anti-MAG	IgM	30-50	80	34	6,3	18,7
		>50	80	72	10,4	14,4
	IgGM	30-50	80	27	9,6	35,3
		>50	80	51	18,8	36,5

Tableau 11

Reproductibilité

Description des échantillons			Reproductibilité			
Analyte	Marqueur enzymatique (isotype)	Catégorie attendue [Rapport en %]	N	Moyenne [Rapport en %]	Écart-type [Rapport en %]	CV [%]
Ac anti-GM1	IgM	30-50	75	51	4,9	9,7
		>50	75	94	7,2	7,7
	IgG	30-50	75	39	5,6	14,5
		>50	75	106	17,1	16,1
Ac anti-GQ1b	IgM	30-50	75	48	3,9	8,2
		>50	75	92	9,9	10,7
	IgG	30-50	75	42	8,1	19,1
		>50	75	78	12,0	15,4
Ac anti-MAG	IgM	30-50	75	43	14,3	33,2
		>50	75	98	23,1	23,5
	IgGM	30-50	75	42	10,6	25,0
		>50	75	97	27,2	28,0

Tableau 12

LoD et LoB

Analyte	LoB [Rapport en %]	LoD [Rapport en %]
Ac IgM anti-GM1	5	21
Ac IgG anti-GM1	6	15
Ac IgM anti-MAG	12	26
Mix Ac IgG/IgM anti-MAG	14	27
Ac IgM anti-GQ1b	3	17
Ac IgG anti-GQ1b	8	18

Tableau 13

Réactivité croisée

Anticorps attribué	Diagnostic	#
Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA)	Vascularite	3
	Autres (échantillons désignés positifs à ANCA)	10
Anticorps anti-nucléaires (ANA)	Lupus érythémateux disséminé	5
	Polyarthrite rhumatoïde	9
	Syndrome de Sjögren	6
	Autres (échantillons désignés positifs à ANA)	3
Anticorps anti-thyroglobuline (anti-Tg)	Thyroïdite auto-immune	5
Anticorps anti-ribonucléoprotéine	Connectivite mixte	1
Anti-GQ1b, anti-GM1, anti-GD1b	Neuropathies périphériques auto-immunes	1
Anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine et anti-tyrosine kinase spécifique de muscle	Myasthénie auto-immune	7

Tableau 14

Neuropathies périphériques	#
Alcoolique	1
Diabétique	5
Troubles imitant les neuropathies périphériques	**#**
Sclérose latérale amyotrophique (SLA)	15
Sarcoïdose	4
Macroglobulinémie de Waldenström (MW)	4
Maladie de Chagas	5

Tableau 15

TABLEAUX ET FIGURES

Performances cliniques

Étude	Contrôles positifs (cas)	Contrôles négatifs	Épitope	Sensi-bilité	Spéci-ficité
Hashemilar et al., 2014	GBS pédiatrique (n = 45)	CM (n = 35)	GM1	0,51	0,89
			GQ1b	0,56	0,74
Sharma et al., 2011	GBS pédiatrique (n = 57)	CN (n = 42)	GM1	0,82	0,33
		CM (n = 35)			0,83
Khandelwal et al., 2006	GBS (n = 13)	CS (n = 19)	GM1	0,31	0,74
Uetz-von Allmen et al., 1998	GBS, CIDP (n = 19, 14)	CN (n = 100)	GM1	0,30	0,93
		CS (n = 110)			0,95
Spatola et al., 2016	GBS (MFS) (n = 12)	CM (n = 34)	GQ1b	0,92	0,97
Delmont et al., 2019	Neuropathie à MAG (n = 41)	CN (n = 112) CS (n = 6)	HNK-1 (MAG)	0,98	0,99

Tableau 16

GBS, syndrome de Guillain-Barré ; CM, contrôle maladie non neurologique ; CN, contrôle neurologique ; CS, contrôle sain ; MFS, syndrome de Miller-Fisher ; CIDP, polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA

Microplaque pré-coatée

↓ *laver 2 x avec ≥300 µL tampon de lavage (froid)*

100 µL de calibrateur, de contrôles ou d'échantillons de sérum (1/50e)

↓ *incuber 2 heures(±5 min) à 2-8 °C*

laver 3 x avec ≥300 µL tampon de lavage (froid)

ajouter 100 µL de marqueur(s) enzymatique(s)

↓ *incuber 2 heures (±5 min) à 2-8 °C*

laver 3 x avec ≥300 µL tampon de lavage (froid)

ajouter 100 µL de substrat TMB (température ambiante) !

↓ *incuber 30 min (±2 min) à 18-28 °C*
sur un agitateur de plaque ~400-600 rpm

ajouter 100 µL de solution stop (température ambiante) !

➡ **Lire l'absorbance à 450 nm (dans les 30 minutes)**

TEMPS AVANT RÉSULTAT : 4,5 HEURES

RÉFÉRENCES

1. Herrendorff, R. et al. Selective in vivo removal of pathogenic anti-MAG autoantibodies, an antigen-specific treatment option for anti-MAG neuropathy. *PNAS* **114**(18), E3689-E3698 (2017).

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

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

4. Steck, A. J. Anti-MAG neuropathy: From biology to clinical management. J. Neuroimmunology **361** (2021).

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

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

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

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

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

10. Delmont, E. et al. Relevance of anti-HNK1 antibodies in the management of anti-MAG neuropathies. *J. Neurol*. **266**, 1973–1979 (2019).

JOURNAL DES MODIFICATIONS

Date	Version	Modification
2023-08-17	A1	Modification du chapitre *Utilisation prévue* et du nom du produit Retrait du ganglioside GM2 et introduction du ganglioside GT1a Reformulation du *Principe du dosage* avec les catégories de titre négatif, zone grise, positif Nouvelles stabilités des réactifs Mise à jour du chapitre *Avertissements et précautions* Révision des chapitres *Prélèvement et conservation des échantillons, Procédure de dosage,* et *Standardisation et traçabilité métrologique* Reformulation du chapitre *Contrôle de qualité* Mise à jour du chapitre *Limites* Révision des chapitres *Intervalles de référence et valeur seuil, Caractéristiques de performance,* et *Substances interférentes* Introduction du chapitre *Performances cliniques* Révision des chapitres *Références* et *Symboles* Ajout du numéro de l'organisme notifié au marquage CE – procédure d'évaluation de la conformité selon IVDR 2017/746

RAPPORTS D'INCIDENTS DANS LES ÉTATS MEMBRES DE L'UE

En cas d'incident grave en lien avec ce dispositif, signalez-le sans délai au fabricant et à l'autorité compétente de votre État membre.

DOMMAGES PENDANT L'EXPEDITION

Veuillez notifier votre distributeur si vous avez reçu un produit endommagé.

SYMBOLES

BÜHLMANN utilise des symboles et des signes énumérés et décrits dans l'ISO 15223-1. En outre, les symboles et signes suivants sont utilisés:

Symbole	Description
MP	Microplaque
BUF WASH 10X	Tampon de lavage concentré (10x)
BUF INC	Tampon d'incubation
CAL	Calibrateur
CONTROL -	Contrôle négatif
CONTROL L	Contrôle bas
CONTROL M	Contrôle moyen
EL IgG	Marqueur enzymatique IgG
EL IgM	Marqueur enzymatique IgM
EL MIX	Marqueur enzymatique Mix IgG/IgM
SUBS TMB	Substrat TMB
SOLN STOP	Solution stop

CE 0123