



BÜHLMANN

GanglioCombi™ MAG ELISA

with enzyme labels IgG/IgM Mix, IgG and IgM

**Detection of anti-ganglioside
and -MAG auto-antibodies by ELISA**
(“MAG”, GM1, GM2, GD1a, GD1b, and GQ1b)

EK-GCM 2 x 96 wells

Revision date: 2017-07-17

ENGLISH

INTENDED USE

BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA, is an *in vitro* diagnostic test intended to detect auto-antibodies against defined relevant neural antigens/epitopes 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 auto-antibodies and indicate a possible auto-immune neuropathy.
2. Testing with individual IgG and/or IgM conjugates allows auto-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™ MAG ELISA is based on the enzyme-immunometric assay technique. The wells of the provided microtiter plate are coated with gangliosides: GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b as well as with a synthetic MAG (Myelin Associated Glycoprotein) "mimotope". The MAG "mimotope" is a synthetic sulphated disaccharide. It mimics a MAG carbohydrate epitope, HNK-1, recognized by anti-MAG auto-antibodies.

Calibrator, controls, and patient sera are incubated in the microtiter wells and anti-ganglioside and/or -MAG auto-antibodies present in the samples bind to the immobilized gangliosides or MAG-analogue. 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 or MAG-analogue. 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 auto-antibodies present in a given sample. The titres of auto-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 and MAG analogue	2 x 12 x 8 wells	B-GCM-MP	Ready to use
Plate Sealer	6 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10x) with preservatives	2 bottles 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
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/IgM Mix Anti-human IgG and IgM Ab conjugated to HRP in a protein-based buffer with preservatives	2 vials 11 mL each	B-GCO-ELGM	Ready to use
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
TMB Substrate TMB in citrate buffer	2 vials 11 mL	B-TMB	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	2 vials 11 mL	B-STTS	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. Do not freeze!
Controls	
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 the 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 b).
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 1A).

- 4c. Patient serum: Pipet 100 µL of diluted patient serum 1 into wells C1-H1 (refer to figure 1A).
- 4d. Patient serum: Pipet 100 µL of diluted patient serum 2 into wells C2-H2 (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-H1 (refer to figure 1B).
- 4d'. Patient serum: Pipet 100 µL of diluted patient serum 2 into wells C2-H2 (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, and 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 steps 3-10 been kept at 2-8 °C? ii) accuracy of the 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. Only IgM anti-“MAG” and IgM anti-GM2 auto-antibody isotypes have been described in the clinical literature (ref. 1, 2, 6, 7).
3. Grey zone and positive results for the “MAG” epitope obtained with enzyme label IgG/IgM mix or enzyme label IgM may be retested with the BÜHLMANN anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG).
4. IgM auto-antibodies against GD1a are very rare and have been shown not to be of primary clinical relevance (ref. 1, 2, 6, 7).
5. 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.
6. 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.
7. The BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG 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 ¹		
Titre Category / Ratio (%)	<30	30-50	>50
“MAG”	Negative	Refer to limitations ^{2,3}	Refer to limitations ^{2,3}
GM1		Retest at a later time point	Positive
GM2		Refer to limitations ^{2,4}	Refer to limitations ^{2,4}
GD1a		Retest at a later time point	Positive
GD1b			
GQ1b			

Table 3

	Isotype: IgG		
Titre Category / Ratio (%)	<30	30-50	>50
“MAG”	Negative	Refer to limitations ²	Refer to limitations ²
GM1		Retest at a later time point	Positive
GM2		Refer to limitations ²	Refer to limitations ²
GD1a		Retest at a later time point	Positive
GD1b			
GQ1b			

Table 4

	Isotype: IgM		
Titre Category / Ratio (%)	<30	30-50	>50
“MAG”	Negative	Refer to limitations ³	Refer to limitations ³
GM1		Retest at a later time point	Positive
GM2		Refer to limitations ⁴	Refer to limitations ⁴
GD1a			
GD1b			
GQ1b		Retest at a later time point	Positive

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 normal blood donors¹ (adult men and women ≤ and ≥50 years of age) and n = 277 pathological samples². Sera were assayed for auto-antibodies against each of the five gangliosides (GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b) with IgG, IgM or IgG/IgM enzyme label detection and for auto-antibodies against MAG with IgM enzyme label detection, according to the assay procedure. Results of normal blood donors are shown in table 18.

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 received from local blood collecting service, CH

² received from Friedrich-Baur-Institute, Ludwig-Maximilians-University of Munich, DE; University Hospital, Basel, Department of Neurology, CH; Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Lyon Sud; Department of Neurology, University of Lyon, FR

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision (within-run):

“MAG”: 3.4-15.0 % CV GM1: 1.4-5.7 % CV
GM2: 2.0-14.2 % CV GD1a: 1.5-7.7 % CV
GD1b: 2.3-4.4 % CV GQ1b: 2.6-5.2 % CV

For each of the five gangliosides coated on the microtiter plate 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 with one reagent lot. For the synthetic “MAG” epitope coated on the microtiter plate, four anti-MAG positive sera were selected and were assayed in twelve replicates in a single run with enzyme label IgM with two reagent lots. The results are summarized in table 9, 10, 11 and 12.

Inter-Assay Precision (between-run):

“MAG”: 5.6-15.1 % CV GM1: 9.0-21.0 % CV
GM2: 5.0-16.5 % CV GD1a: 11.1-24.1 % CV
GD1b: 8.0-13.2 % CV GQ1b: 8.2-19.6 % CV

For each of the five gangliosides coated on the microtiter plate 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. For the synthetic “MAG” epitope coated on the microtiter plate, four anti-MAG positive sera were selected and were assayed in duplicates in ten independent runs, with one run per day, with enzyme label IgM. The inter-assay precision studies were performed with one reagent lot. The results are summarized in table 13, 14, 15 and 16.

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. As MAG auto-antibody testing can only be interpreted in the context of IgM detection, the “MAG” epitope was assayed with IgM enzyme label only. 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, ≤3.5 % the enzyme label IgG and ≤5.3 % the enzyme label IgM. The highest LoB obtained with the three different enzyme labels was taken to determine the overall Limit of Blank (LoB). The LoB was calculated 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 five gangliosides as well as the synthetic “MAG” coated on the microtiter plate a single clinical sample representing low antibody concentration was selected. The low-level samples were measured in twelve replicates, in a single run for each of the three enzyme labels: IgG/IgM Mix, IgG and IgM. As MAG auto-antibody testing can only be interpreted in the context of IgM detection, the “MAG” epitope was assayed with IgM enzyme label only. 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 ≤6.9 % for enzyme label IgM. The highest LoD obtained with the three different enzyme labels was taken to determine the overall Limit of Detection (LoD).

Functional Sensitivity: ≤8.1 % ratio

Precision values obtained for serum samples in the inter-assay precision study were plotted against their mean % ratio values. A cubic polynomial fit was applied to the data points to obtain a precision profile. As an intersection of the one-sided 95 % confidence interval of the fit with the 20 % CV acceptance criterion was not observed, the functional sensitivity was determined as equal to the LoD. The results are summarized in figure 2

Linearity

The linear range of the BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG 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™ MAG ELISA titre categories of <30 % - negative; 30-50 % - grey-zone; 50-100 % positive and >100 % strongly positive was confirmed for all five gangliosides coated on the microtiter plate. For the synthetic “MAG” epitope an upper linear range limit of 75 % ratio, within the positive titer category, was observed. The results are summarized in table 17.

Method Comparison for the MAG “mimotope”:**Anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG): $\kappa = 0.85$** **Anti-SGPG Autoantibodies ELISA (EK-SGPG): $\kappa = 0.77$**

Eighty (80) clinical serum samples with anti-MAG IgM autoantibody signals over the entire measuring range were assayed in singlets with IgM enzyme label detection on “MAG” coated microtiter plates and with the anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG) and the anti-SGPG Autoantibodies ELISA (EK-SGPG) test. Measurements were performed using two “MAG” coated microtiter plate lots. The results were analysed with Kappa statistics. The correlation data is illustrated in figure 3A and 3B.

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; hemoglobin: 400 mg/dL; hemolyzate (hemolyzed blood): 400 mg/dL and triglycerides (Intralipid®): 2000 mg/dL.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zur Detektion von Autoantikörpern gegen definierte relevante neuronale Antigene / Epitope in Serumproben von Patienten mit Verdacht auf eine periphere Neuropathie mit unbekannter Ätiologie. Er 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 Autoantikörpern überprüft, um eine mögliche Autoimmun-Neuropathie anzuzeigen.
2. Durch die Analyse mit individuellen Enzymmarker-IgG und/oder -IgM wird die Anwesenheit von Isotyp-Autoantikörpern 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 Enzymmarkern-IgG und -IgM (Option 2) erfolgen.

PRINZIP DER METHODE

Der vorliegende BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA Test ist ein enzym-immunometrischer Festphasentest. Die Mikrotiterplatte ist streifenweise mit Gangliosiden GM1, GM2, GD1a, GD1b und GQ1b sowie einem synthetischen MAG (Myelin assoziiertes Glykoprotein) "Mimotope" beschichtet. Das MAG "Mimotop" ist ein synthetisches sulfatiertes Disaccharid. Es ahmt ein MAG Kohlenhydratepitop nach (HNK-1) und wird von Anti-MAG-Autoantikörpern erkannt.

Kalibrator, Kontrollen und Serumproben werden in den Wells der Mikrotiterplatte inkubiert und die potenziell vorhandenen anti-Gangliosid- und/oder -MAG Autoantikörper binden an die immobilisierten Ganglioside oder das MAG Analogon. Durch Waschschriffe werden ungebundene Substanzen entfernt, die Autoantikörper mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierten Antikörpern 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 oder MAG-Analoga gebunden sind. Die Zugabe einer sauren Stopplösung (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 Autoantikörper in den Proben. Der Titer wird als % Ratio des Kalibrators 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 und einem MAG Analogon	2 x 8 x 12 Wells	B-GCM-MP	Gebrauchsfertig
Abdeckfolien	6 Stück	-	-
Waschpufferkonzentrat (10x) Mit Konservierungsmitteln	2 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/IgM Mix Anti-human -IgG und -IgM Ak, gekoppelt mit HRP in einem Protein-basierten Puffer (Puffer mit Konservierungsmitteln)	2 Flaschen 11 mL/Fisch.	B-GCO-ELGM	Gebrauchsfertig
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
TMB-Substrat in Zitrat-gepufferter Lösung	2 Flaschen 11 mL/Fisch.	B-TMB	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M Schwefelsäure	2 Flaschen 11 mL/Fisch.	B-STs	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 versetzte Aluminiumpackung zurückbringen. Packung völlig schliessen. Bis zu 4 Monate bei 2-8 °C haltbar.
Verdünnter Waschpuffer	Zu verwenden bis 4 Monate nach der Verdünnung. 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 Komponenten humaner Herkunft. Bestandteile humanen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten sie gemäss „Guter Laborpraxis“ (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- Stopp-Lösung: Die Stopp-Lösung (B-STTS) 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, sowie 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. Je nach orbitalen Mikrotiterplatten-Schüttler empfehlen wir 400-600 U/min. Die Lösung in den Wells soll in Bewegung gebracht werden, darf aber nicht überschwapfen.
- 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 auf Seite 10 (Kap.: 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, danach Serum abgiessen.
- 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 Aufbewahrung 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 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 bestücken. 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. Waschpuffer entleeren und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen.

Hinweis: Fahren Sie den Testlauf 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 die Wells C1-H1 pipettieren (siehe Abbildung 1A).
- 4d. 100 µL verdünnte Serumprobe 2 in die Wells C2-H3 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-H1 pipettieren (siehe Abbildung 1B).

4d'. 100 µL verdünnte Serumprobe 2 in die Wells C2-H2 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 den nachfolgenden Wells oder eine neue 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 mindestens dreimal mit jeweils ≥ 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 Enzymmarkern, 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-Substratlösung auf 18-28 °C bringen.

10. 100 µL TMB-Substratlösung 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 der „Guten Laborpraxis“ (GLP) und durch die Einhaltung der Anleitung erreicht.

Da es keine kommerziell erhältlichen Kontrollen für Anti-Gangliosid-Autoantikörper gibt, wird empfohlen, positive und negative Serumproben als interne Qualitätskontrolle zu verwenden.

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 lot-spezifisch 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 3-9 bei 2-8 °C verarbeitet? ii) Genauigkeit der Pipetten, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, iii) Photometereichung und verwendeter Filter (450 nm) iv) Verfallsdaten der Reagenzien, v) Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, vi) TMB-Substratlösung sollte farblos sein, vii) Wasserreinheit.

STANDARDISIERUNG

Der Kalibrator in diesem Kit ist gegen eine interne Referenz kalibriert, die auf 100 % eingestellt ist.

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 zwischen 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™ MAG 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 positive Ergebnisse, die mit dem Enzymmarker-IgG/IgM Mix erhalten wurden, vor einer weiteren Isotypenbestimmung mittels individuellen Enzymmarkern-IgG und IgM mit einem Kliniker / überweisenden Neurologen besprochen werden.
- In der klinischen Literatur wurden nur IgM anti-„MAG“ und IgM anti-GM2 Autoantikörper Isotypen beschrieben (Ref. 1, 2, 6, 7).
- Grauzonen- oder positive Ergebnisse für das „MAG“-Epitop, die mit dem Enzymmarker-IgG/IgM Mix oder dem Enzymmarker-IgM erhalten wurden, können mit den BÜHLMANN anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG) erneut geprüft werden.
- IgM Autoantikörper gegen GD1a sind sehr selten und haben sich als nicht klinisch relevant erwiesen (Ref. 1, 2, 6, 7).
- 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 Autoimmunantikörpern (Ref. 6) und der Unterschiede 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™ MAG ELISA wurde nicht für Plasmaphorese-Proben validiert.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

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

Isotyp: IgG/IgM Mix ¹			
Titerkategorien / Ratio (%)	<30	30-50	>50
„MAG“	Negativ	Siehe Einschränkungen ^{2,3}	Siehe Einschränkungen ^{2,3}
GM1		Erneutes Prüfen zu einem späteren Zeitpunkt	Positiv
GM2		Siehe Einschränkungen ^{2,4}	Siehe Einschränkungen ^{2,4}
GD1a			
GD1b			
GQ1b		Erneutes Prüfen zu einem späteren Zeitpunkt	Positiv

Tabelle 7

	Isotyp: IgG		
Titerkategorien / Ratio (%)	<30	30-50	>50
"MAG"	Negativ	Siehe Einschränkungen ²	Siehe Einschränkungen ²
GM1		Erneutes Prüfen zu einem späteren Zeitpunkt	Positiv
GM2		Siehe Einschränkungen ²	Siehe Einschränkungen ²
GD1a		Erneutes Prüfen zu einem späteren Zeitpunkt	Positiv
GD1b			
GQ1b			

Tabelle 8

	Isotyp: IgM		
Titerkategorien / Ratio (%)	<30	30-50	>50
"MAG"	Negativ	Siehe Einschränkungen ³	Siehe Einschränkungen ³
GM1		Erneutes Prüfen zu einem späteren Zeitpunkt	Positiv
GM2		Siehe Einschränkungen ⁴	Positiv
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

Tabelle 9

REFERENZINTERVALLE UND GRENZWERT

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

Die Werte wurden auf der Grundlage einer Auswertung von n = 100 Blutspendern¹ (Männer und Frauen ≤ und ≥50 Jahren) und n = 277 Patientenproben mit pathologischen Befunden² ermittelt. Die Seren wurden auf jedes der 5 Gangliosid-Antikörper (GM1, GM2, GD1a, GD1b und GQ1b) mit dem Enzymmarker-IgG und -IgM, bzw. mit dem Enzymmarker-IgG/IgM Mix und für Autoantikörper gegen MAG mit dem Enzymmarker-IgM entsprechend der Arbeitsvorschrift analysiert. Die Resultate der Blutspender sind in Tabelle 18 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) Blutspende Dienst, Bern (CH)

²) Erhalten vom Friedrich-Baur-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München (DE), Universitäts Spital Basel; Abt. Neurologie (CH); Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Lyon Sud; Departement de Neurologie, Lyon (FR); Département Neurologique de l'Université de Lyon (FR).

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision (innerhalb eines Testlaufs):

"MAG": 3,4-15,0 % CV GM1: 1,4-5,7 % CV

GM2: 2,0-14,2 % CV GD1a: 1,5-7,7 % CV

GD1b: 2,3-4,4 % CV GQ1b: 2,6-5,2 % CV

Für jedes der fünf Gangliosiden, die auf der Mikrotiterplatte beschichtet sind, wurden zwei anti-Gangliosid-positive Seren ausgewählt. Die Serumproben wurden in zwölf Replikaten in einem einzelnen Testlauf mit allen Enzymmarker: IgG/IgM Mix, IgG und IgM und mit einem Lot geprüft. Für das synthetische „MAG“-Epitop, das auf der Mikrotiterplatte beschichtet ist, wurden vier anti-MAG-positive Seren ausgewählt und in zwölf Replikaten in einem einzelnen Testlauf mit dem Enzymmarker-IgM mit zwei Lots getestet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 9, 10, 11 und 12 zusammengestellt.

Inter-Assay-Präzision (zwischen den Testläufen):

"MAG": 5,6-15,1 % CV GM1: 9,0-21,0 % CV

GM2: 5,0-16,5 % CV GD1a: 11,1-24,1 % CV

GD1b: 8,0-13,2 % CV GQ1b: 8,2-19,6 % CV

Für jedes der fünf auf der Mikrotiterplatte beschichteten Gangliosiden wurden zwei anti-Gangliosid-positive Seren ausgewählt. Die Serumproben wurden mit jedem Enzymmarker: IgG/IgM Mix, IgG und IgM in einzelnen Replikaten in 20 unabhängigen Durchgängen - mit einem Testlauf pro Tag - geprüft. Für das synthetische „MAG“-Epitop, das auf der Mikrotiterplatte beschichtet ist, wurden vier anti-MAG-positive Seren ausgewählt und in Duplikaten in zehn unabhängigen Durchgängen, mit einem Testlauf pro Tag, mit dem Enzymmarker IgM getestet. Die Inter-Assay Präzisionsstudien wurden mit einem Lot durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 13, 14, 15 und 16 zusammengestellt.

LoB – Limit of Blank: Ratio $\leq 6,1$ %

Der LoB wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP17-A bestimmt. Zwölf Blank-Replikate (Inkubationspuffer) pro Gangliosid wurden mit allen drei Enzymmarker: IgG/IgM Mix, IgG und IgM in einem einzelnen Testlauf getestet. Da die MAG-Autoantikörper Prüfung nur im Kontext der IgM-Detektion interpretiert werden kann, wurde das „MAG“-Epitop nur mit dem Enzymmarker-IgM getestet. Für den LoB, der als % Ratio zur Absorption des Kalibrators dargestellt wird, wurde für den Enzymmarker-IgG/IgM Mix einen Wert von $\leq 6,1$ %, für den Enzymmarker-IgG einen Wert von $\leq 3,5$ % und für den Enzymmarker-IgM einen Wert von $\leq 5,3$ % berechnet. Die höchste mit den drei unterschiedlichen Enzymmarker erhaltene LoB wurde verwendet, um den gesamten LoB zu ermitteln. Der LoB wurde mithilfe einer parametrischen Analyse berechnet.

LoD – Limit of Detection: Ratio $\leq 8,1$ %

Der LoD wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP17-A festgesetzt. Für jedes der fünf Ganglioside sowie das synthetische „MAG“, die auf der Mikrotiterplatte beschichtet wurden, wurde eine einzelne klinische Probe ausgewählt, die eine niedrige Antikörperkonzentration repräsentiert. Die Proben mit niedrigen Konzentrationen wurden in zwölf Replikaten in einem einzelnen Testlauf mit allen drei Enzymmarker: IgG/IgM Mix, IgG und IgM getestet. Da die MAG-Autoantikörper Prüfung nur im Kontext der IgM-Detektion interpretiert werden kann, wurde das „MAG“-Epitop nur mit dem Enzymmarker-IgM getestet. Für den LoD wurde für den Enzymmarker-IgG/IgM Mix als % Ratio zur Absorption des Kalibrators ein Wert von $\leq 8,1$ %, für den Enzymmarker-IgG ein Wert von $\leq 6,3$ % und für den Enzymmarker-IgM ein Wert von $\leq 6,9$ % berechnet. Der höchste mit den drei unterschiedlichen Enzymmarker erhaltene LoD wurde verwendet, um den gesamten LoD zu ermitteln.

Funktionelle Sensitivität: Ratio $\leq 8,1$ %

Die in der Inter-Assay Präzisionsstudie mit Serumproben erhaltenen Präzisionswerte wurden gegen ihre mittlere % Ratio-Werte aufgetragen. Es wurde ein kubischer polynomialer Fit auf die Datenpunkte angewendet, um ein Präzisionsprofil zu erhalten. Da keine Überschneidung des einseitigen 95 % Konfidenzintervall Fits mit dem 20 % CV-Akzeptanzkriterium beobachtet wurde, wurde die funktionelle Empfindlichkeit als gleichwertig mit dem LoD bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

Linearität

Der lineare Bereich des BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA wurde gemäss der CLSI-Richtlinie EP06-A bestimmt. Mehrere Seren mit Konzentrationen über den gesamten Messbereich des Tests wurden verwendet. Dadurch konnte die Mehrzahl der Gangliosid-/ Enzymmarkerkombinationen bestimmt werden. Die Serumproben wurden gemäss der Gebrauchsanweisung verdünnt. Bei stark positiven Serumproben wurde eine höhere Verdünnung von 1:2000 verwendet. Anschliessende Verdünnungsreihen jeder Probe wurde in Abstufungen von 10 % hergestellt mit Inkubationspuffer als Verdünnungsmittel. Die Linearität wurde als das Intervall definiert, in dem die relative Differenz zwischen dem linearen Fit und - falls signifikant - dem polynomialen Fit einer höheren Ordnung unter 20 % lag. Bei Ratios ≤ 25 % wurde eine absolute Differenz des Ratios von unter 5 % erlaubt. Es wurde für die mit allen fünf Gangliosiden beschichtete Mikrotiterplatte ein linearer Bereich bestätigt, der die BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA Titerkategorien von <30 % - negativ; 30-50 % - Grauzone; 50-100 % positiv und >100 % stark positiv abdeckt und darüber hinausgeht. Für das synthetische „MAG“-Epitop wurde eine Obergrenze des linearen Bereichs mit einem 75 % Ratio innerhalb der positiven Titerkategorie beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

Methodenvergleich für das MAG „Mimotop“:**Anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG): $\kappa = 0,85$** **Anti-SGPG Autoantibodies ELISA (EK-SGPG): $\kappa = 0,77$**

80 klinische Serumproben mit Anti-MAG IgM-Autoantikörpersignalen über den gesamten Messbereich wurden untersucht in Einfachmessungen mittels Enzymmarker-IgM mit „MAG“-beschichteten Mikrotiterplatten, mit dem anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG) und dem anti-SGPG Autoantibodies ELISA (EK-SGPG). Die Messungen wurden mit Lots von „MAG“-beschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der Kappa-Statistik analysiert. Die Korrelationsdaten sind in Abbildung 3A und 3B dargestellt.

STÖRSUBSTANZEN

Mit den folgenden Substanzen wurde bis zu den folgenden Konzentrationen keine Interferenz nachgewiesen: unkonjugiertes Bilirubin (ikterische Seren): 40 mg/d; konjugiertes Bilirubin (ikterische Seren): 60 mg/dL; Hämoglobin: 400 mg/dL; Hämolyt (hämolytisches Blut): 400 mg/dL und Triglyzeride (Intralipid®): 2000 mg/dL.

DOMAINE D'UTILISATION

Le test de diagnostic *in vitro* BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA est conçu pour la détection d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes/épitopes neuraux définis, 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 ce qui concerne les 3 marqueurs enzymatiques différents, les composants du dispositif permettent trois options d'application :

1. Dépistage de la présence d'auto-anticorps en utilisant le conjugué IgG/IgM Mix, permettant d'indiquer une potentielle neuropathie auto-immune.
2. Détermination de l'isotype de chaque auto-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™ MAG ELISA est basé sur une méthode immunométrique de type "sandwich". Les puits des plaques incluses dans le coffret sont coâtés avec des gangliosides GM1, GM2, GD1a, GD1b GQ1b, et un analogue synthétique de la MAG (Myelin Associated Glycoprotein). Il s'agit d'un disaccharide sulfaté qui mime le HNK-1, l'épitope hydrate de carbone de la MAG reconnu par les auto-anticorps anti-MAG. Les échantillons sériques à tester ainsi que le calibrateur et les contrôles sont incubés dans la microplaque pendant deux heures. Les auto-anticorps anti-gangliosides et/ou anti-MAG présents sont liés aux gangliosides et/ou à l'analogue coâtés 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/anti-analogue MAG 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/anti-analogue MAG 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/anti-analogue MAG sont exprimés quantitativement à l'aide d'un % Ratio du calibrateur.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque coâtée (gangliosides et analogue MAG)	2 x 12 x 8 puits	B-GCM-MP	Prête à l'emploi
Film adhésif	6 pièces	-	-
Tampon de lavage, concentré (10x) avec agents de conservation	2 flacons 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 IgG/IgM Mix Ac anti-IgG et IgM humaines conjugués à la HRP dans un tampon protéique contenant des agents de conservation	2 flacons à 11 mL	B-GCO-ELGM	Prêt à l'emploi
Marqueur enzymatique IgG Ac anti-IgG humaines conjugués à la HRP dans un tampon protéique contenant des agents de conservation	1 flacon 11 mL	B-GCO-ELG	Prêt à l'emploi
Marqueur enzymatique IgM Ac anti-IgM humaines conjugués à la HRP dans un tampon protéique contenant des agents de conservation	1 flacon 11 mL	B-GCO-ELM	Prêt à l'emploi
Substrat TMB TMB dans un tampon citrate	2 flacons à 11 mL	B-TMB	Prêt à l'emploi
Solution Stop acide sulfurique 0.25 M	2 flacons à 11 mL	B-STs	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	Remplacer 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	Stable durant 4 mois à 2-8 °C. Ne pas congeler !
Contrôles	
Tampon d'incubation	
Marqueurs enzymatiques	Stables à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.
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 ce coffret (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-STTS) 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 conserver 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 19 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 isotypes IgG/IgM Mix : étapes 4a à 4e et 7
2. Détection des isotypes 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 4 a et b.
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 le puits A1 (voir figure 1A).
- 4b. Distribuer 100 µL de contrôle moyen dans le puits B1, 100 µL de contrôle bas dans le puits A2 et 100 µL de contrôle négatif dans le 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 H1 (voir figure 1A).
- 4d. Distribuer 100 µL de sérum dilué du patient N° 2 dans les puits C2 à H2 (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 le puits A1 (voir figure 1B).
- 4b'. Distribuer 100 µL de contrôle moyen dans le puits B1, 100 µL de contrôle bas dans le puits A2 et 100 µL de contrôle négatif dans le 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 H1 (voir figure 1B).

- 4d'. Distribuer 100 µL de sérum dilué du patient N° 2 dans les puits C2 à H2 (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 plaque 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 et jeter 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 isotypes 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 3 : Incubation avec le marqueur enzymatique, lavages et détection

8. Recouvrir la plaque à l'aide d'un nouveau film adhésif et incuber à 2-8 °C pendant 2 heures ± 5 minutes. Ne pas agiter la microplaque.
9. Retirer et jeter 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 cette notice est recommandée pour l'utilisation correcte de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

Comme il n'existe pas de sérum de référence pour les anticorps anti-gangliosides disponible dans le commerce, 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 9 ? 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) puretés de l'eau.

STANDARDISATION

Le calibrateur de cette 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 (OD) 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.
- Seuls les isotypes d'auto-anticorps IgM anti-« MAG » et IgM anti-GM2 ont été décrits dans la littérature (réf. 1, 2, 6, 7).
- Les résultats obtenus dans la zone grise et les résultats positifs pour l'épitope « MAG » obtenus avec le mélange de marqueurs enzymatiques « IgG/IgM » Mix ou avec le marqueur enzymatique IgM seul peuvent être à nouveau analysés à l'aide du test BÜHLMANN anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG).
- Les auto-anticorps IgM dirigés contre GD1a sont très rares et il a été montré que leur importance sur le plan clinique n'est pas significative (réf. 1, 2, 6, 7).
- 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™ MAG 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.

Catégorie de titres/ Ratio (%)	Isotype: IgG/IgM Mix ¹		
	<30	30-50	>50
"MAG"	Négatif	Voir Limites, point ^{2,3}	Voir Limites, point ^{2,3}
GM1		Re-tester dans quelques mois	Positif
GM2		Voir Limites, point ^{2,4}	Voir Limites, point ^{2,4}
GD1a			
GD1b		Re-tester dans quelques mois	Positif
GQ1b			

Tableau 10

	Isotype: IgG		
Catégorie de titres/ Ratio (%)	<30	30-50	>50
"MAG"	Négatif	Voir Limites, point ²	Voir Limites, point ²
GM1		Re-tester dans quelques mois	Positif
GM2		Voir Limites, point ²	Voir Limites, point ²
GD1a		Re-tester dans quelques mois	Positif
GD1b			
GQ1b			

Tableau 11

	Isotype: IgM		
Catégorie de titres/ Ratio (%)	<30	30-50	>50
"MAG"	Négatif	Voir Limites, point ³	Voir Limites, point ³
GM1		Re-tester dans quelques mois	Positif
GM2		Voir Limites, point ⁴	Positif
GD1a			
GD1b			
GQ1b		Re-tester dans quelques mois	Positif

Tableau 5

Réaliser un nouveau test avec le BÜHLMANN anti-MAG Autoantibodies ELISA, réf. EK-MAG, est recommandé dans le cas où l'analogue de la MAG est dans la zone grise ou positif.

INTERVALLES DES REFERENCES ET RATIOS SEUILS

En accord avec les institutions mentionnées ci-dessous, nous avons établi une valeur seuil clinique de 50 %. Les valeurs inférieures à 30 % doivent clairement être considérées comme négatives. Les valeurs des rapports ont été obtenues à partir des résultats de n = 100 échantillons de donneurs de sang normaux asymptomatiques (adultes de sexe masculin et féminin, de plus et de moins de 50 ans)¹⁾ et n = 277 échantillons pathologiques²⁾. Les sérums ont été testés pour chacun des cinq gangliosides (GM1, GM2, GD1a, GD1b et GQ1b), avec le marqueur enzymatique IgG, IgM ou IgG/IgM Mix et avec le marqueur enzymatique IgM pour les auto-anticorps anti-MAG, en suivant les instructions de la notice. Les résultats des donneurs de sang sont présentés dans le tableau 18.

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, Bern, CH.

²⁾ Fournis par l'Institut Friedrich Baur de l'Université Ludwig-Maximilian de Munich (DE); le Département de Neurologie de l'Université de Bâle (CH) ; le Département Neurologique de l'Université de Lyon (FR).

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

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

« MAG » : CV 3,4-15,0 % GM1 : CV 1,4-5,7 %

GM2 : CV 2,0-14,2 % GD1a : CV 1,5-7,7 %

GD1b : CV 2,3-4,4 % GQ1b : CV 2,6-5,2 %

Pour chacun des cinq gangliosides revêtus sur la microplaque, deux sérums positifs aux anti-gangliosides ont été sélectionnés. Les échantillons de sérum ont été testés en douze réplicats en un seul dosage pour chacun des marqueurs enzymatiques, « IgG/IgM » Mix, IgG et IgM, avec un seul lot de réactifs. Dans le cas de l'épitope synthétique « MAG » revêtu sur la microplaque, quatre sérums positifs aux anti-MAG ont été sélectionnés. Ils ont été testés en douze réplicats en un seul dosage à l'aide du marqueur enzymatique IgM, avec deux lots de réactifs. Les tableaux 9, 10, 11 et 12 rassemblent les résultats obtenus.

Précision inter-essais (différents dosages) :

« MAG » : CV 5,6-15,1 % GM1 : CV 9,0-21,0 %

GM2 : CV 5,0-16,5 % GD1a : CV 11,1-24,1 %

GD1b : CV 8,0-13,2 % GQ1b : CV 8,2-19,6 %

Pour chacun des cinq gangliosides revêtus sur la microplaque, deux sérums positifs aux anti-gangliosides ont été sélectionnés. Les échantillons de sérum ont été testés en réplicats simples dans 20 dosages indépendants, à raison d'un dosage quotidien, pour chacun des marqueurs enzymatiques : « IgG/IgM » Mix, IgG et IgM. Pour l'épitope synthétique « MAG » revêtu sur la microplaque, quatre sérums positifs aux anti-MAG ont été sélectionnés et testés en double dans dix dosages indépendants, à raison d'un dosage quotidien, à l'aide du marqueur enzymatique IgM. Les études de précision inter-essais ont été réalisées à l'aide d'un seul lot de réactifs. Les tableaux 13, 14, 15 et 16 rassemblent les résultats obtenus.

Limite de blanc (LoB) : ratio $\leq 6,1$ %

La LoB a été établie selon la ligne directrice EP17-A du CLSI. Douze réplicats de blancs (tampon d'incubation) par ganglioside ont été testés en un seul dosage pour chacun des marqueurs enzymatiques : « IgG/IgM » Mix, IgG et IgM. Comme l'analyse de l'auto-anticorps MAG ne peut être interprétée que dans le contexte d'une détection par IgM, l'épitope « MAG » n'a été testé qu'avec le marqueur enzymatique IgM. La limite de blanc (LoB), exprimée sous forme du ratio en % par rapport à l'absorbance du calibrateur, a été calculée comme étant $\leq 6,1$ % pour le mélange de marqueurs enzymatiques IgG/IgM, $\leq 3,5$ % pour le marqueur IgG et $\leq 5,3$ % pour le marqueur IgM. La LoB la plus élevée obtenue avec les trois marqueurs enzymatiques différents a été retenue pour déterminer la limite de blanc (LoB) globale. La LoB a été calculée par analyse statistique paramétrique.

Limite de détection (LoD) : ratio $\leq 8,1$ %

La LoD a été établie selon la ligne directrice EP17-A du CLSI. Pour chacun des cinq gangliosides comme pour l'épitope synthétique « MAG » revêtus sur la microplaque, un seul échantillon clinique présentant une faible concentration en anticorps a été sélectionné. Les échantillons à faible concentration ont été mesurés en douze réplicats en un seul dosage pour chacun des trois marqueurs enzymatiques : « IgG/IgM » Mix, IgG et IgM. Comme l'analyse de l'auto-anticorps MAG ne peut être interprétée que dans le contexte d'une détection par IgM, l'épitope « MAG » n'a été testé qu'avec le marqueur enzymatique IgM. La limite de détection (LoD), exprimée sous forme du ratio en % par comparaison à l'absorbance du calibrateur, a été calculée comme étant $\leq 8,1$ % pour le mélange de marqueurs enzymatiques IgG/IgM, $\leq 6,3$ % pour le marqueur IgG et $\leq 6,9$ % pour le marqueur IgM. La LoD la plus élevée obtenue avec les trois marqueurs enzymatiques différents a été retenue pour déterminer la limite de détection (LoD) globale.

Sensibilité fonctionnelle : ratio $\leq 8,1$ %

Les valeurs de précision obtenues avec les échantillons de sérum dans l'étude de précision inter-essais ont été portées graphiquement en fonction de leurs valeurs moyennes de ratio en %. Les points ont été ajustés au moyen d'une fonction polynomiale cubique de manière à obtenir un profil de précision. Aucune intersection de l'intervalle de confiance unilatéral à 95 % de la courbe d'ajustement avec le critère d'acceptation d'un CV de 20 % n'étant observée, la sensibilité fonctionnelle a été déterminée comme étant égale à la LoD. Les résultats sont résumés sur la figure 2.

Linéarité

L'intervalle de linéarité du test BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG 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™ MAG ELISA, à savoir < 30 % (négatif), 30-50 % (zone grise), 50-100 % (positif) et > 100 % (fortement positif), a été confirmé pour l'ensemble des cinq gangliosides revêtus sur la microplaque. Dans le cas de l'épitope synthétique « MAG », une limite supérieure de l'intervalle de linéarité égale à 75 % de ratio, à l'intérieur de la catégorie de titres « positif », a été observée. Les résultats sont résumés dans le tableau 17.

Comparaison des méthodes pour le « mimotope » MAG :**Anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG): $\kappa = 0,85$** **Anti-SGPG Autoantibodies ELISA (EK-SGPG): $\kappa = 0,77$**

80 échantillons cliniques de sérum présentant des signaux auto-anticorps IgM anti-MAG répartis dans toute la plage de mesure ont été testés en simple exemplaire à l'aide du marqueur enzymatique de détection IgM sur des microplaques revêtues de l'épitope « MAG » et au moyen des tests ELISA anti-MAG Autoantibodies (EK-MAG) et anti-SGPG Autoantibodies (EK-SGPG). Les mesures ont été réalisées sur deux lots de microplaques revêtues de l'épitope « MAG ». La méthode statistique de Kappa a servi à analyser les résultats. Les figures 3A et 3B illustrent les données de corrélation.

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 : 400 mg/dL ; hémolysat (sang hémolysé) : 400 mg/dL ; triglycérides (Intralipid®) : 2 000 mg/dL.

USO PREVISTO

Il BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA è un test diagnostico *in vitro* per l'identificazione di auto-anticorpi contro rilevanti e definiti antigeni/epitopi neurali in campioni di siero di pazienti con sospette neuropatie periferiche con una eziologia sconosciuta. Il test consente la classificazione quantitativa dei risultati in categorie definite in base al titolo degli auto-anticorpi 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. Il test con il Mix dei coniugati IgG / IgM permette di screenare la presenza di auto-anticorpi e indicare una possibile neuropatia autoimmune.
2. Il test con singoli coniugati IgG e / o IgM permette di determinare l'isotipo degli auto-anticorpi.
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™ MAG ELISA si basa sulla tecnica del dosaggio enzimatico immunometrico. I pozzetti della micropiastra fornita sono pre-coattati con gangliosidi GM1, GM2, GD1a, GD1b e GQ1b e con un sintetico MAG (glicoproteina associata alla mielina) "mimotope". Il MAG "mimotope" è un disaccaride solfato sintetico. Mima l'HNK-1, un epitopo carboidrato del MAG, riconosciuto dagli auto-anticorpi anti-MAG.

Il calibratore, i controlli ed i sieri dei pazienti vengono incubati nei pozzetti della micropiastra e gli anti-ganglioside e / o autoanticorpi anti-MAG (Ab) presenti vengono legati dai gangliosidi immobilizzati o dal MAG-analogo. Dopo il lavaggio delle sostanze non legate, gli auto-anticorpi legati vengono rilevati con anticorpi contro IgG e / o IgM coniugati con la perossidasi del rafano (HRP). A seguito di un secondo lavaggio per eliminare il reagente anticorpo-enzima non legato, viene aggiunta ai pozzetti una soluzione di substrato contenente tetrametilbenzidina (TMB). Una colorazione blu si sviluppa in maniera proporzionale al quantitativo di auto-anticorpi anti ganglioside legati nella procedura 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 viene misurata a 450 nm.

L'assorbanza misurata è proporzionale al titolo di auto-anticorpi presenti in un dato campione. I titoli di auto-anticorpi sono espressi come rapporto percentuale (%) del calibratore e possono essere assegnati a categorie di titolo (negativo, zona grigia, positivo, fortemente positivo).

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropiastra Precoattata con gangliosidi	2 x 12 x 8- pozzetti	B-GCM-MP	Pronta all'uso
Foglio per sigillare la piastra	6 fogli	-	-
Tampone di lavaggio concentrato (10x) Con conservanti	2 flaconi 100 mL	B-GCO-WB	Diluire con 900 mL di acqua deionizzata
Tampone di incubazione Con conservanti	1 flaconi 100 mL	B-GCO-IB	Pronto all'uso
Calibratore Liofilizzato con conservanti	1 flacone	B-GCO-CA	Aggiungere 1.5 mL di tampone di incubazione
Controllo negativo, basso ed medio; Liofilizzati con conservanti	3 flaconi	B-GCO-CONSET	Aggiungere 1.5 mL di tampone di incubazione
Marcatore enzimatico IgG/IgM Mix Anticorpi Anti- IgG e IgM umane coniugati con HRP in un tampone a base proteica con conservanti	2 flacone a 11 mL	B-GCO-ELGM	Pronto all'uso
Marcatore enzimatico IgG Anticorpi Anti- IgG umane coniugati con HRP in un tampone a base proteica con conservanti	1 flacone 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 flacone 11 mL	B-GCO-ELM	Pronto all'uso
Substrato di TMB In tampone citrato	2 flaconi 11 mL	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione bloccante 0.25 M di acido solforico	2 flaconi 11 mL	B-ST5	Pronto all'uso agente corrosivo

Tabella 1

CONSERVAZIONE E SCADENZA 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 strisce non ancora utilizzate nella busta di alluminio che contiene essiccante e risigillarla. 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. Non congelare!
Controlli	
Tampone di incubazione	Conservare a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sulle etichette.
Marcatore enzimatico	
Substrato di TMB	Conservare a 18-28 °C fino alla data di scadenza indicata sulla etichetta.
Soluzione bloccante	

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 assorbente
- Agitatore orbitale per micropiastra
- Lettore per micropiastra per la 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 (BPL) utilizzando le dovute precauzioni.
- Soluzione bloccante: La soluzione bloccante (B-STs) 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 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 conservarlo 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 la temperatura ambiente (18-28 °C).
- Punto 11: Agitare la micropiastra durante l'incubazione con il substrato TMB. A seconda del tipo di agitatore è consigliata una velocità orbitale di 400-600 rpm. La micropiastra deve essere agitata efficacemente ma facendo in modo di evitare la fuoriuscita di liquido.
- Usando dispositivi automatici per lavaggio/ aspirazione della micropiastra, vi si consiglia l'utilizzo della modalità: "plate mode"; dispensazione sequenziale in tutte le strisce 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 crociate.
- I micro pozzetti non possono essere riutilizzati.

PRELIEVO DEI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

- La procedura richiede <0.1 ml di sangue e <50 µl di siero, rispettivamente.
- Per quanto riguarda le interferenze di campioni emolizzati, lipemici o itterici, fare riferimento a pagina 20.
- 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.
- Si raccomanda di aliquotare i campioni per evitare ripetuti cicli di congelamento / scongelamento.
- I campioni conservati a ≤-20 °C sono stabili fino ad 4 mesi. Per periodi di conservazione più lunghi, (più di un anno) mantenere 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 Mix-isotipi IgG / IgM: punto 4a-4e e 7
- (2) Individuazione di isotipi IgG e IgM: 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 la piastra con un numero di strisce a sufficienza per effettuare il numero di test necessari. Estrarre le strisce 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 a volta di tampone di lavaggio refrigerato per pozzetto. Svuotare i pozzetti e battere con forza la piastra su carta assorbente assicurandosi che i pozzetti siano completamente vuoti.

Importante: Procedere immediatamente con i punti successivi.

Opzione 1: Individuazione dei Mix-isotipi IgG / IgM:

- 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 figura 1A).

- 4c. Siero del paziente: pipettare 100 µL di siero del paziente 1 diluito nei pozzetti C1-H1 (vedi figura 1A).
- 4d. Siero del paziente: pipettare 100 µL di siero del paziente 2 diluito nei pozzetti C2-H2 (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 isotipi IgG

- 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 Figure 1B).

- 4c'. Siero del paziente: pipettare 100 µL di siero del paziente 1 diluito nei pozzetti C1-H1 (vedi figura 1B).
- 4d'. Siero del paziente: pipettare 100 µL di siero del paziente 2 diluito nei pozzetti C2-H2 (vedi figura 1B).
- 4e'. Siero del paziente: pipettare 100 µL di siero del paziente 3 a 12 diluito nei prossimi pozzetti.

Individuazione di isotipi IgM

- 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 ed eliminare il foglio protettivo. Svuotare i pozzetti e lavarli tre volte utilizzando almeno 300 µL di tampone di lavaggio refrigerato (2-8 °C) per pozzetto. Svuotare i pozzetti e battere con forza la piastra su carta assorbente.

Per l'opzione 1: individuazione di Mix di isotipi IgG/IgM

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

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

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

Per l'opzione 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. Svuotare i pozzetti e lavare tre volte utilizzando almeno 300 µL di tampone di lavaggio freddo (2-8 °C) per pozzetto. Svuotare i pozzetti e battere la piastra energicamente su carta assorbente.
- Importante: Lasciare che il Substrato TMB raggiunga la temperatura ambiente (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 per 30 ±2 minuti a 18-28 °C. Proteggere la piastra dalla luce diretta.
 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 BPL) e seguendo accuratamente le istruzioni contenute in questa metodica. Poiché non vi è nessun siero di controllo per gli anticorpi anti-gangliosidi, 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.

Si prega di consultare la scheda tecnica del controllo di qualità fornito con il kit per gli intervalli di confidenza.

Le prestazioni del dosaggio dovrebbero essere dentro i limiti stabiliti. Se le prestazioni non correlano con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude errori nella manualità, 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 dell'ELISA washer e reader; 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 incluso in questo kit è stato calibrato verso un pool di materiale di riferimento interno. È stato aggiustato ad un valore pari al 100 %.

RISULTATI E CALCOLO

Calcolo dei risultati:

- Annotare l'assorbanza (OD) a 450 nm per ciascun pozzetto (calibratore, controlli e campioni).
- Fare la 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.

Mix isotipi IgG/IgM

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

Isotipi IgG e IgM

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

Su molti lettori per piastra sono già presenti programmi che calcolano direttamente i risultati in rapporto percentuale.

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 della 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.
- La letteratura clinica riporta unicamente descrizioni degli isotipi IgM degli auto-anticorpi anti-"MAG" e anti-GM2 (rif. 1, 2, 6, 7).
- È possibile ritestare con il sistema BÜHLMANN per auto-anticorpi anti-MAG ELISA (EK-MAG) i risultati di zona grigia e i positivi per l'epitopo "MAG", ottenuti con la mix di marcatori enzimatici IgG/IgM o con marcatore enzimatico IgM.
- Gli auto-anticorpi IgM anti-GD1a sono molto rari ed è stato dimostrato che non sono di primaria rilevanza clinica (rif. 1, 2, 6, 7).
- Le risposte autoimmuni dominanti possono essere accompagnate da reattività crociata con altri gangliosidi analizzati. La reattività crociata evidenzia solitamente un'elevata variazione inter-dosaggio e può non essere clinicamente rilevante. L'interpretazione dei risultati deve pertanto essere condotta esclusivamente assieme a un esperto/specialista.
- Data la poli-reattività 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™ MAG ELISA non è stato convalidato per i campioni ottenuti da plasmateresi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le limitazioni corrispondenti, ove presenti, sono indicate con numeri in apice.

Categorie Titolo / Ratio (%)	Isotipo: IgG/IgM Mix ¹		
	<30	30-50	>50
"MAG"	Negativo	Fare riferimento alle limitazioni ^{2,3}	Fare riferimento alle limitazioni ^{2,3}
GM1		Ripetere il test su un prelievo ad un tempo successivo.	Positivo
GM2		Fare riferimento alle limitazioni ^{2,4}	Fare riferimento alle limitazioni ^{2,4}
GD1a		Fare riferimento alle limitazioni ^{2,4}	Fare riferimento alle limitazioni ^{2,4}
GD1b		Ripetere il test su un prelievo ad un tempo successivo	Positivo
GQ1b		Ripetere il test su un prelievo ad un tempo successivo	Positivo

Tabella 12

	Isotipo: IgG		
Categorie Titolo / Ratio (%)	<30	30-50	>50
"MAG"	Negativo	Fare riferimento alle limitazioni ²	Fare riferimento alle limitazioni ²
GM1		Ripetere il test su un prelievo ad un tempo successivo	Positivo
GM2		Fare riferimento alle limitazioni ²	Fare riferimento alle limitazioni ²
GD1a		Ripetere il test su un prelievo ad un tempo successivo	Positivo
GD1b			
GQ1b			

Tabella 13

	Isotipo: IgM		
Categorie Titolo / Ratio (%)	<30	30-50	>50
"MAG"	Negativo	Fare riferimento alle limitazioni ³	Fare riferimento alle limitazioni ³
GM1		Ripetere il test su un prelievo ad un tempo successivo	Positivo
GM2			
GD1a		Fare riferimento alle limitazioni ⁴	Fare riferimento alle limitazioni ⁴
GD1b		Ripetere il test su un prelievo ad un tempo successivo	Positivo
GQ1b			

Tabella 14

INTERVALLO DI REFERENZA E CUT-OFF

In cooperazione con diversi istituti, è stato stabilito un cut-off clinico del 50 %. Valori <30 % si possono classificare come decisamente negativi. Le categorie di titolo stabiliti si basano su n = 100 donatori volontari¹ per il sangue normale (uomini e donne adulti ≤ e ≥50 anni di età) e n = 277 campioni² patologici. I sieri sono stati analizzati per auto-anticorpi contro ciascuna dei cinque gangliosidi (GM1, GM2, GD1a, GD1b e GQ1b) con IgG, IgM o con rilevazione di marcato enzimatico IgG/IgM e per gli auto-anticorpi contro MAG con rilevazione di marcato enzimatico IgM, secondo la procedura del test. I risultati dei donatori sani sono presentati nella tabella 18.

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

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

Tabella 6

¹ Raccolti presso il centro donatori di sangue di Berna (CH).

² Ricevuto da Friedrich-Baur-Institut Ludwig-Maximilians-University di Monaco (GER); Dipartimento di Neurologia, Università di Basilea (CH); Dipartimento di Neurologia, Centro Ospedaliero Universitario (CHU) di Lyon Sud (FR); Dipartimento di Neurologia Universitario di Lyon (FR).

PRESTAZIONI DEL DOSAGGIO

Precisione intra-dosaggio (unica sessione):

"MAG": 3.4-15.0 % CV GM1: 1.4-5.7 % CV
GM2: 2.0-14.2 % CV GD1a: 1.5-7.7 % CV
GD1b: 2.3-4.4 % CV GQ1b: 2.6-5.2 % CV

Per ciascuno dei cinque gangliosidi coattati sulla micropietra sono stati selezionati due sieri anti-ganglioside positivi. I campioni di siero sono stati dosati in dodici replicati in un'unica sessione per ciascuno dei marcatori enzimatici: mix IgG/IgM, IgG e IgM con reagenti provenienti dallo stesso lotto. Per l'epitopo "MAG" sintetico coattato sulla micropietra, quattro sieri anti-MAG positivi sono stati selezionati e dosati in dodici replicati in un'unica sessione con marcatore enzimatico IgM condue lotti di reagenti. I risultati sono riepilogati nelle tabelle 9, 10, 11 e 12.

Precisione inter-dosaggio (tra diverse sessioni):

"MAG": 5.6-15.1 % CV GM1: 9.0-21.0 % CV
GM2: 5.0-16.5 % CV GD1a: 11.1-24.1 % CV
GD1b: 8.0-13.2 % CV GQ1b: 8.2-19.6 % CV

Per ciascuno dei cinque gangliosidi coattati sulla micropietra sono stati selezionati due sieri anti-ganglioside positivi. I campioni di siero sono stati dosati in singoli replicati per venti sessioni indipendenti, una per giorno, per ciascuno dei marcatori enzimatici: IgG/IgM Mix, IgG e IgM. Per l'epitopo "MAG" sintetico coattato sulla micropietra, quattro sieri anti-MAG positivi sono stati selezionati e dosati in duplicato in dieci sessioni indipendenti, una per giorno, con il marcatore enzimatico IgM. Gli studi sulla precisione inter-dosaggio sono stati condotti con reagenti provenienti da un unifico lotto. I risultati sono riepilogati nelle tabelle 13, 14, 15 e 16.

Limite del bianco (Limit of Blank, LoB): ≤ 6.1 % rapporto

Il LoB è stato stabilito secondo le linee guida CLSI EP17-A. Dodici replicati di campione bianco (tampone di incubazione) sono stati dosati in un'unica sessione per tutti i tre marcatori enzimatici: IgG/IgM Mix, IgG e IgM. Dato che i test per auto-anticorpi MAG possono essere interpretati esclusivamente nel contesto del rilevamento IgM, l'epitopo "MAG" è stato dosato unicamente con marcatore enzimatico IgM. Il limite del bianco (Limit of Blank, LoB), espresso come rapporto % rispetto all'assorbanza del calibratore, è stato calcolato essere ≤ 6.1 % per marcatore enzimatico mix IgG/IgM, ≤ 3.5 % per marcatore enzimatico IgG e ≤ 5.3 % per marcatore enzimatico IgM. Il LoB è stato determinato come il valore massimo tra i tre LoB ottenuti per i tre diversi marcatori enzimatici. Il LoB è stato calcolato mediante analisi parametrica.

Limite di rilevabilità (Limit of Detection, LoD): ≤ 8.1 % rapporto

Il LoD è stato stabilito secondo le linee guida CLSI EP17-A. Per ciascuno dei cinque gangliosidi e il "MAG" sintetico coattato sulla micropiastre, è stato selezionato un singolo campione clinico a rappresentare una bassa concentrazione di anticorpi. I campioni di siero a bassa concentrazione sono stati dosati in dodici replicati in un'unica sessione per ciascuno dei tre marcatori enzimatici: IgG/IgM Mix, IgG e IgM. Dato che i test per auto-anticorpi MAG possono essere interpretati esclusivamente nel contesto del rilevamento IgM, l'epitopo "MAG" è stato dosato unicamente con marcatore enzimatico IgM. Il LoD, espresso come rapporto % rispetto all'assorbanza del calibratore, è stato calcolato essere ≤ 8.1 % per marcatore enzimatico mix IgG/IgM, ≤ 6.3 % per marcatore enzimatico IgG e ≤ 6.9 % per marcatore enzimatico IgM. Il LoD complessivo è stato determinato come il valore massimo tra i tre LoD ottenuti per i tre diversi marcatori enzimatici.

Sensibilità funzionale: ≤ 8.1 % rapporto

I valori di precisione ottenuti per i campioni di siero nello studio sulla precisione inter-dosaggio sono stati tracciati in grafico contro i rispettivi valori medi di rapporto %. Il profilo di precisione è stato ottenuto applicando ai dati un'interpolazione polinomiale cubica. Non essendo stata individuata alcuna intersezione tra intervallo di confidenza unilaterale al 95 % e criterio di accettazione del 20 % CV, la sensibilità funzionale è stata determinata essere pari al LoD. I risultati sono riepilogati in figura 2

Linearità

L'intervallo di linearità del sistema BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA è stato determinato secondo le linee guida CLSI EP06-A. Sono stati impiegati diversi campioni di siero contenenti concentrazioni distribuite sull'intera gamma di misurazione del test, in modo da consentire la valutazione della maggior parte delle combinazioni ganglioside - marcatore enzimatico. I campioni di siero sono stati diluiti come stabilito nelle istruzioni per l'uso. Ai campioni di siero altamente positivi è stata applicata una diluizione maggiore pari a 1:2000. È stata preparata una serie di diluizioni seriali a partire da ciascun campione, con graduazioni del 10 %, usando tampone di incubazione come diluente. La linearità è stata definita come l'intervallo entro cui la differenza relativa tra interpolazione lineare e, se rilevante, interpolazione polinomiale di ordine superiore, è minore del 20 %. Per rapporti ≤ 25 %, sono state ammesse differenze inferiori al 5 % del rapporto. È stato confermato un intervallo di linearità che copre e supera le categorie di titolo BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA del < 30 % - negativo; 30 - 50 % - zona grigia; 50 - 100 % positivo e > 100 % altamente positivo, per tutti i cinque gangliosidi coattati sulla micropiastre. Per l'epitopo "MAG" sintetico è stato osservato un intervallo di linearità con limite superiore pari a 75 % del rapporto, nella categoria di titolo positivo. I risultati sono riepilogati nella tabella 17.

Confronto metodi per "mimotopo" MAG:**Auto-anticorpi Anti-MAG ELISA (EK-MAG): $\kappa = 0.85$** **Auto-anticorpi Anti-SGPG ELISA (EK-SGPG): $\kappa = 0.77$**

80 campioni clinici di siero con segnali di auto-anticorpi IgM anti-MAG nell'intero intervallo di misurazione sono stati dosati in singolo con rilevamento a marcatore enzimatico IgM con "MAG" coattato su micropiastre e con il test per auto-anticorpi anti-MAG ELISA (EK-MAG) e il test per auto-anticorpi anti-SGPG ELISA (EK-SGPG). Le misure sono state eseguite usando due micropiastre provenienti da due lotti con "MAG" coattato. I risultati sono stati analizzati tramite statistica Kappa. I dati di correlazione sono illustrati in figura 3A e 3B.

INTERFERENZE

Non sono state rilevate interferenze con le seguenti sostanze fino alle concentrazioni indicate: bilirubina non coniugata (siero itterico): 40 mg/dL; bilirubina coniugata (siero itterico): 60 mg/dL; emoglobina: 400 mg/dL; emolisi (sangue emolizzato): 400 mg/dL e trigliceridi (Intralipid®): 2000 mg/dL.

USO PREVISTO

BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA es una prueba diagnóstica in vitro destinada a la detección de auto-anticuerpos frente a los antígenos neurales definidos como relevantes 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 auto-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™ MAG ELISA se basa en la técnica de ensayo inmunométrico enzimático. Los pocillos de la placa de microtitulación suministrada están recubiertos con gangliósidos: GM1, GM2, GD1a, GD1b y GQ1b, así como con un "mimótopo" de MAG (glicoproteína asociada a mielina) sintético. El "mimótopo" de MAG es un disacárido sulfatado sintético. Emula a un epítipo carbohidrato de MAG, HNK-1, reconocido por auto-anticuerpos anti-MAG.

El calibrador, los controles y los sueros de paciente se incuban en los pocillos de microtitulación, con lo que los auto-anticuerpos frente a gangliósidos y/o MAG presentes en las muestras se unen a los gangliósidos o el análogo de MAG 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 a los gangliósidos o el análogo de MAG 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).

Revision date: 2017-07-17

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Placa de microtitulación Previamente recubierta con gangliósidos y análogo de MAG	2 x 12 x 8 pocillos	B-GCM-MP	Listo para usar
Sellador de placas	6 unidades	-	-
Tampón de lavado concentrado (10 veces) Con conservantes	2 frascos 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
Mezcla de marcadores enzimáticos Anticuerpos anti-IgG e IgM humanas conjugados con HRP en un tampón proteico con conservantes	2 viales 11 mL	B-GCO-ELGM	Listo para usar
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
Substrato TMB TMB en tampón citrato	2 viales 11 mL	B-TMB	Listo para usar
Solución de interrupción Ácido sulfúrico 0,25 M	2 viales 11 mL	B-STS	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 lo congele!
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.

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-STs) 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 25 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 H1 (consulte la figura 1A).
- 4d. Suero de paciente: Pipetee 100 µL de suero del paciente nº 2 diluido en los pocillos C2 a H2 (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 H1 (consulte la figura 1B).

4d'. Suero de paciente: Pipetee 100 µL de suero del paciente nº 2 diluido en los pocillos C2 a H2 (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 n° 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.
- En la literatura clínica solo se han descrito los isotipos de autoanticuerpos IgM anti-"MAG" e IgM anti-GM2 (ref. 1, 2, 6, 7).
- Los resultados en zona gris y positivos para el epítipo de "MAG" obtenidos con la mezcla de marcadores enzimáticos de IgG/IgM o el marcador enzimático de IgM pueden reensayarse con la prueba BÜHLMANN anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG).
- Los autoanticuerpos IgM frente a GD1a son muy raros y se ha demostrado que no son de relevancia clínica importante (ref. 1, 2, 6, 7).
- 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™ MAG ELISA no ha sido validada para muestras de plasmáfesis.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

Categoría de título / Relación (%)	Isotipo: IgG/IgM Mix ¹		
	<30	30-50	>50
"MAG"	Negativo	Consultar las limitaciones ^{2,3}	Consultar las limitaciones ^{2,3}
GM1		Repetir la prueba más adelante	Positivo
GM2		Consultar las limitaciones ^{2,4}	Consultar las limitaciones ^{2,4}
GD1a		Repetir la prueba más adelante	Positivo
GD1b			
GQ1b			

Tabla 15

	Isotipo: IgG		
Categoría de título / Relación (%)	<30	30-50	>50
"MAG"	Negativo	Consultar las limitaciones ²	Consultar las limitaciones ²
GM1		Repetir la prueba más adelante	Positivo
GM2		Consultar las limitaciones ²	Consultar las limitaciones ²
GD1a		Repetir la prueba más adelante	Positivo
GD1b			
GQ1b			

Tabla 16

	Isotipo: IgM		
Categoría de título / Relación (%)	<30	30-50	>50
"MAG"	Negativo	Consultar las limitaciones ³	Consultar las limitaciones ³
GM1		Repetir la prueba más adelante	Positivo
GM2		Consultar las limitaciones ⁴	Consultar las limitaciones ⁴
GD1a			
GD1b		Repetir la prueba más adelante	Positivo
GQ1b			

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 sangre normal¹ (hombres y mujeres adultos menores y mayores de 50 años de edad) y un número n = 277 muestras patológicas². Los sueros se ensayaron para auto-anticuerpos frente a cada uno de los cinco gangliósidos (GM1, GM2, GD1a, GD1b y GQ1b) mediante la detección de marcadores enzimáticos de IgG, IgM o IgG/IgM y para auto-anticuerpos frente a MAG mediante la detección de marcadores enzimáticos de IgM según el procedimiento de ensayo. Los resultados de los donantes de sangre normal se muestran en la tabla 18.

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

Interpretación clínica	Categoría de título/ Relación (%)
Negativo	<30
Zona gris	30-50
Corte	50
Positivo	>50-100
Fuertemente positivo	>100

Tabla 6

¹ muestras De los servicios de donación de sangre Berna, Suiza

² muestras recibidas del Instituto Friedrich-Baur, Universidad Ludwig-Maximilian de Munich, Alemania; Departamento de Neurología del Hospital Universitario de Basilea, Suiza; Centro Hospitalario Universitario (CHU) de Lyon Sur, Francia; Departamento de Neurología de la Universidad de Lyon, Francia

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Precisión intraensayo (dentro de una misma ejecución):

"MAG": 3,4-15,0 % CV GM1: 1,4-5,7 % CV
GM2: 2,0-14,2 % CV GD1a: 1,5-7,7 % CV
GD1b: 2,3-4,4 % CV GQ1b: 2,6-5,2 % CV

Para cada uno de los cinco gangliósidos de recubrimiento de la placa de microtitulación 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 con un lote de reactivo. Para el epítipo de "MAG" sintético de recubrimiento de la placa de microtitulación se seleccionaron cuatro sueros positivos para anticuerpos anti-MAG que se ensayaron en doce réplicas en una única ejecución con el marcador enzimático de IgM con dos lotes de reactivo. Los resultados se resumen en las tablas 9, 10, 11 y 12.

Precisión interensayo (entre ejecuciones):

"MAG": 5,6-15,1 % CV GM1: 9,0-21,0 % CV
GM2: 5,0-16,5 % CV GD1a: 11,1-24,1 % CV
GD1b: 8,0-13,2 % CV GQ1b: 8,2-19,6 % CV

Para cada uno de los cinco gangliósidos de recubrimiento de la placa de microtitulación 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. Para el epítipo de "MAG" sintético de recubrimiento de la placa de microtitulación se seleccionaron cuatro sueros positivos para anticuerpos anti-MAG que se ensayaron por duplicado en diez ejecuciones independientes, una ejecución al día, con el marcador enzimático de IgM. Los estudios de precisión interensayo se realizaron con un lote de reactivo. Los resultados se resumen en las tablas 13, 14, 15 y 16.

Límite para el blanco (LoB): Relación $\leq 6,1$ %

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. Puesto que los resultados del análisis de autoanticuerpos frente a MAG solo se pueden interpretar en el contexto de la detección de IgM, el epítipo de "MAG" se ensayó con el marcador enzimático de IgM únicamente. El límite para el blanco (LoB) expresado como la relación porcentual con respecto a la absorbancia del calibrador se calculó como $\leq 6,1$ % para la mezcla de marcadores enzimáticos de IgG/IgM, $\leq 3,5$ % para el marcador enzimático de IgG y $\leq 5,3$ % 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 para el blanco (LoB) global. El LoB se calculó con un análisis paramétrico.

Límite de detección (LoD): Relación $\leq 8,1$ %

El LoD se estableció de conformidad con la directriz CLSI EP17-A. Para cada uno de los cinco gangliósidos y el "MAG" sintético de recubrimiento de la placa de microtitulación se seleccionó una única muestra clínica representativa de una concentración de anticuerpos baja. Las muestras con nivel bajo se midieron en doce réplicas en una única ejecución para cada uno de los tres marcadores enzimáticos: mezcla IgG/IgM, IgG e IgM. Puesto que los resultados del análisis de autoanticuerpos frente a MAG solo se pueden interpretar en el contexto de la detección de IgM, el epítipo de "MAG" se ensayó con el marcador enzimático de IgM únicamente. El LoD expresado como la relación porcentual con respecto a la absorbancia del calibrador se calculó como $\leq 8,1$ % para la mezcla de marcadores enzimáticos de IgG/IgM, $\leq 6,3$ % para el marcador enzimático de IgG y $\leq 6,9$ % 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.

Sensibilidad funcional: Relación $\leq 8,1$ %

Los valores de precisión obtenidos para las muestras de suero en el estudio de precisión interensayo se representaron gráficamente frente a sus valores medios de relación porcentual. Se aplicó un ajuste polinómico cúbico a los puntos de datos para obtener un perfil de precisión. Puesto que no se observó intersección del intervalo de confianza unilateral del 95 % del ajuste con el criterio de aceptación del 20 % de CV, la sensibilidad funcional se determinó como igual al LoD. Los resultados se resumen en la figura 2.

Linealidad

El rango lineal de la prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA se determinó de conformidad con la directriz CLSI EP06-A. Se utilizaron varios sueros con concentraciones que abarcaban 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 %. Para los cinco gangliósidos de recubrimiento de la placa de microtitulación se confirmó un rango lineal que cubría y excedía las categorías de título de < 30 % - negativo; 30 - 50 % - zona gris; 50 - 100 % positivo y > 100 % fuertemente positivo de la prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA. Para el epítipo de "MAG" sintético se observó un límite superior del rango lineal del 75 % de relación, dentro de la categoría de título positivo. Los resultados se resumen en la tabla 17.

Comparación de métodos para el "mimótopo" de MAG:

Anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG): $\kappa = 0,85$

Anti-SGPG Autoantibodies ELISA (EK-SGPG): $\kappa = 0,77$

80 muestras clínicas de suero con señales de autoanticuerpos IgM anti-MAG que abarcaban todo el rango de medición se ensayaron en réplicas individuales con la detección del marcador enzimático de IgM en placas de microtitulación recubiertas con "MAG" y con las pruebas anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG) y anti-SGPG Autoantibodies ELISA (EK-SGPG). Las determinaciones se realizaron utilizando dos lotes de placa de microtitulación recubierta con "MAG". Los resultados se analizaron con el parámetro estadístico Kappa. Los datos de correlación se ilustran en las figuras 3A y 3B.

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: 400 mg/dL; hemolizado (sangre hemolizada): 400 mg/dL y triglicéridos (Intralipid®): 2000 mg/dL.

APLICAÇÃO DO TESTE

O BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA é um teste de diagnóstico *in vitro* para detecção de auto-anticorpos contra antígenos / epítopos 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™ MAG ELISA se baseia na técnica de ensaio imunométrico enzimático. Os poços na placa de microtitulação fornecida são revestidos com os gangliosídeos GM1, GM2, GD1a, GD1b e GQ1b, bem como um “mimótopo” sintético da MAG (glicoproteína associada a mielina). O “mimótopo” do MAG é um dissacarídeo sulfatado sintético. Ele imita um epítipo de carboidrato MAG, o HNK-1, reconhecido por auto-anticorpos anti-MAG.

O calibrador, os controles e o soro dos pacientes são incubados nos poços de microtitulação e os auto-anticorpos anti-gangliosídeos e/ou anti-MAG presentes nas amostras ligam-se aos gangliosídeos imobilizados ou ao análogo da MAG. 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 auto-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 auto-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	2 x 12 x 8 poços	B-GCM-MP	Pronto para uso
Selador da placa	6 peças	-	-
Tampão de Lavagem Concentrado (10X) com preservativos	2 tubos 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-humanos conjugados 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	2 frascos da 11 mL	B-TMB	Pronto para uso
Solução stop 0,25 M de ácido sulfúrico	2 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 desidratadores 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.

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 dos testes 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.
- Etapas 9: deixe que o substrato de TMB atinja a temperatura ambiente (18-28 °C) antes de usá-lo.
- Etapas 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.
- 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 4a - 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 1A).

- 4c. Soro dos pacientes: pipete 100 µL de soro diluído 1 dos pacientes nos poços C1-H1 (consulte a [figura 1A](#)).
- 4d. Soro dos pacientes: pipete 100 µL de soro diluído 2 dos pacientes nos poços C2-H2 (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-H1 (consulte a [figura 1B](#)).
- 4d'. Soro dos pacientes: pipete 100 µL de soro diluído 2 dos pacientes nos poços C2-H2 (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 3-9 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. Somente os isotipos de autoanticorpos IgM anti-MAG e IgM anti-GM2 foram descritos na literatura clínica (ref. 1, 2, 6, 7).
3. A zona cinza e os resultados positivos para o epítipo de MAG com um mix de marcadores enzimáticos IgG/IgM ou com o marcador enzimático IgM podem ser testados novamente com o teste BÜHLMANN anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG).
4. Os autoanticorpos IgM contra GD1a são muito raros, tendo-se demonstrado que eles não apresentam relevância clínica primária (ref. 1, 2, 6, 7).

5. 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.
6. 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.
7. O BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG 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 ¹		
Corte e categorias / relações de títulos (%)	<30	30-50	>50
"MAG"	Negativo	Consulte as limitações ^{2,3}	Consulte as limitações ^{2,3}
GM1		Teste novamente num ponto de tempo posterior	Positivo
GM2		Consulte as limitações ^{2,4}	Consulte as limitações ^{2,4}
GD1a			
GD1b		Teste novamente num ponto de tempo posterior	Positivo
GQ1b			

Tabela 18

	Isotipo: IgG		
Corte e categorias / relações de títulos (%)	<30	30-50	>50
"MAG"	Negativo	Consulte as limitações ²	Consulte as limitações ²
GM1		Teste novamente num ponto de tempo posterior	Positivo
GM2		Consulte as limitações ²	Consulte as limitações ²
GD1a			
GD1b		Teste novamente num ponto de tempo posterior	Positivo
GQ1b			

Tabela 19

	Isotipo: IgM		
Corte e categorias / relações de títulos (%)	<30	30-50	>50
"MAG"	Negativo	Consulte as limitações ³	Consulte as limitações ³
GM1		Teste novamente num ponto de tempo posterior	Positivo
GM2			
GD1a		Consulte as limitações ⁴	Consulte as limitações ⁴
GD1b		Teste novamente num ponto de tempo posterior	Positivo
GQ1b			

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 ≤ e ≥50 anos) e n = 277 amostras patológicas². As amostras de soro foram analisadas para auto-anticorpos contra cada um dos cinco gangliosídeos (GM1, GM2, GD1a, GD1b e GQ1b), com a detecção dos marcadores enzimáticos IgG, IgM ou IgG/IgM, e para auto-anticorpos contra MAG, com detecção do marcador enzimático IgM, de acordo com o procedimento do ensaio. Os resultados para doadores de sangue normais são mostrados na tabela 18.

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 recebidas de Blutspende Dienst, Berne, CH

² recebidas do Friedrich-Baur-Institute, Ludwig-Maximilians-University of Munich, GE; University Hospital, Basel, Department of Neurology, CH; Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Lyon Sud; Department of Neurology, University of Lyon, FR.

CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO

Precisão intraensaio:

MAG: 3,4 % - 15,0 % do CV; GM1: 1,4 % - 5,7 % do CV;

GM2: 2,0 % - 14,2 % do CV; GD1a: 1,5 % - 7,7 % do CV;

GD1b: 2,3 % - 4,4 % do CV; GQ1b: 2,6 % - 5,2 % do CV;

Para cada um dos cinco gangliosídeos revestidos na placa de microtitulação, dois soros antigangliosídeos positivos foram selecionados. As amostras de soro foram testadas em doze replicações em uma única corrida para cada um dos marcadores enzimáticos: Mix de IgG/IgM, IgG e IgM com um lote de reagente. Para o epítipo de MAG sintético revestido na placa de microtitulação, quatro soros anti-MAG positivos foram selecionados e testados em doze replicações em uma única corrida com o marcador enzimático IgM e dois lotes de reagentes. Os resultados estão resumidos nas tabelas 9, 10, 11 e 12.

Precisão interensaio:

MAG: 5,6% - 15,1% do CV; GM1: 9,0% - 21,0% do CV;

GM2: 5,0% - 16,5% do CV; GD1a: 11,1 % - 24,1% do CV;

GD1b: 8,0% - 13,2% do CV; GQ1b: 8,2 % - 19,6% do CV.

Para cada um dos cinco gangliosídeos revestidos na placa de microtitulação, 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. Para o epítipo de MAG sintético revestido na placa de microtitulação, quatro soros anti-MAG positivos foram selecionados e testados em duplicatas em dez corridas independentes, uma por dia, com o marcador enzimático IgM. Os estudos de precisão interensaio foram realizados com um lote de reagentes. Os resultados estão resumidos nas tabelas 13, 14, 15 e 16.

Limite do branco (LoB): ≤6,1 %

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. Uma vez que os resultados do teste de autoanticorpos MAG somente podem ser interpretados no contexto da detecção de IgM, o epítipo de MAG foi testado somente com o marcador enzimático 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, ≤3,5 % para o marcador enzimático IgG e ≤5,3 % para o marcador enzimático IgM. O valor mais alto do LoB obtido com os três marcadores enzimáticos diferentes foi usado para determinar o Limite do branco (LoB) geral. O LoD foi calculado usando-se análise paramétrica.

Limite de detecção (LoD): $\leq 8,1$ %

O LoD foi estabelecido de acordo com a diretriz EP17-A do CLSI. Para cada um dos cinco gangliosídeos e para o MAG sintético revestido na placa de microtitulação, uma única amostra clínica, representando uma baixa concentração de anticorpos, foi selecionada. As amostras de baixo nível foram medidas em doze replicações em uma única corrida para cada um dos três marcadores enzimáticos: Mix de IgG/IgM, IgG e IgM. Uma vez que os resultados do teste de autoanticorpos MAG somente podem ser interpretados no contexto da detecção de IgM, o epítipo de MAG foi testado somente com o marcador enzimático IgM. O Limite de detecção (LoD), expresso como a % da absorbância do calibrador, foi calculado como $\leq 8,1$ % para o mix de marcadores enzimáticos IgG/IgM, $\leq 6,3$ % para o marcador enzimático IgG e $\leq 6,9$ % para o marcador enzimático IgM. O valor mais alto do LoD obtido com os três marcadores enzimáticos diferentes foi usado para se determinar o Limite de detecção (LoD) geral.

Sensibilidade funcional: $\leq 8,1$ %

Os valores de precisão obtidos para amostras de soro no estudo de precisão interensaio foram plotados contra seus valores percentuais médios. Um ajuste polinomial cúbico foi aplicado aos pontos de dados para se obter um perfil de precisão. Como não se observou uma intersecção do intervalo de confiança de 95 % unilateral do ajuste com o critério de aceitação de 20 % do CV, determinou-se que a sensibilidade funcional é igual ao LoD. Os resultados estão resumidos na figura 2.

Linearidade

A faixa linear do GanglioCombi™ MAG ELISA BÜHLMANN foi determinada de acordo com a diretriz de teste EP06-A do CLSI. Foram usados múltiplos soros com concentrações distribuídas em toda a faixa de medição do teste, 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 de soro com resultado alto positivo, uma diluição maior foi aplicada (1:2000). Subsequentemente, séries de diluição de cada amostra foram preparadas em graduações de 10 %, usando-se 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 ≤ 25 %, uma diferença absoluta abaixo de 5 % foi permitida. Uma faixa linear abrangendo e ultrapassando as categorias de títulos do GanglioCombi™ MAG ELISA BÜHLMANN de < 30 % - negativo; 30 – 50 % - zona cinza; 50 – 100 % positivo, e >100 % fortemente positivo, foi confirmada para todos os cinco gangliosídeos revestidos na placa de microtitulação. Para o epítipo de MAG sintético, um limite superior da faixa linear de 75 % foi observado na categoria de titulação positiva. Os resultados estão resumidos na tabela 17.

Comparação de métodos para o "mimótopo" de MAG:**Anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG): $\kappa = 0,85$** **Anti-SGPG Autoantibodies ELISA (EK-SGPG): $\kappa = 0,77$**

80 amostras clínicas de soro com sinais de autoanticorpos IgM anti-MAG em toda a faixa de medição foram testadas em singlets com a detecção do marcador enzimático IgM em placas de microtitulação revestidas com MAG e com o teste anti-MAG Autoantibodies ELISA (EK-MAG) e o anti-SGPG Autoantibodies ELISA (EK-SGPG). As medições foram realizadas usando-se dois lotes de placas de microtitulação revestidas com MAG. Os resultados foram analisados com estatísticas Kappa. Os dados de correlação podem ser vistos nas figuras 3A e 3B.

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: 400 mg/dL; hemolisado (sangue hemolisado): 400 mg/dL e triglicérides (Intralipid®): 2000 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: IgG/IgM-Mix label

		IgG/IgM Mix											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Calibrator	CAL	CTRL Low	CAL	CTRL Low									
Control	CTRL Med	CTRL Neg	CTRL Med	CTRL Neg									
„MAG“													
GM1													
GM2													
GD1a													
GD1b													
GQ1b													
		Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5							

Figure 1A: ≤ 24 patients / Kit (2 MP / Kit)

Microtiter plate set-up: IgG & IgM labels

	IgG				IgM											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
Calibrator	CAL	CTRL Low		CAL	CTRL Low											
Control	CTRL Med	CTRL Neg		CTRL Med	CTRL Neg											
„MAG“																
GM1																
GM2																
GD1a																
GD1b																
GQ1b																
	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 1	Patient 2	Patient 3										

Figure 1B : 2 profiles / patient, ≤ 12 patients / Kit (2 MP / Kit)

Example of Results

A IgG/IgM-Mix label

B-GCO-ELGM	Absorbance (OD450)	Ratio [%]	Result/ Suggestion
Calibrator	1.415		
Calibrator Avg.	1.445		
Calibrator Avg.	1.430	200	
Medium Control	0.498	69	
Med. Control Avg.	0.482	67	
Med. Control Avg.	0.490	68	
Low Control	0.195	27	
Low Control	0.191	26	
Low Control Avg.	0.193	27	
Negative Control	0.090	12	
Neg. Control Avg.	0.100	14	
Neg. Control Avg.	0.095	13	
Sample 1 „MAG“	0.300	42	Retest EK-MAG
Sample 1 GM1	0.544	76	Positive
Sample 1 GM2	0.106	15	Negative
Sample 1 GD1a	0.162	45	Grey zone
Sample 1 GD1b (w	0.745	104	Strongly positive
Sample 1 GQ1b	0.090	13	Negative

Table 7

Example of Results

B IgG & IgM labels

Enzyme label	Absorbance (OD450)		Ratio [%]		Category	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM						
Calibrator	1.789	2.576				
	1.833	2.527				
Calibrator Avg.	1.836	2.551	100	100		
Medium Control	1.267	1.743	69	68		
	1.237	1.764	67	69		
Med. Control Avg.	1.252	1.753	68	69		
Low Control	0.567	0.938	30	37		
	0.584	0.942	32	37		
Low Control Avg.	0.571	0.940	31	37		
Neg. Control	0.061	0.098	3	4		
	0.051	0.095	3	4		
Neg. Control Avg.	0.056	0.097	3	4		
Sample 1 „MAG“	0.532	0.208	29	8	Not relevant	Neg.
Sample 1 GM1	0.171	3.814	9	150	Neg.	Strong. Pos.
Sample 1 GM2	0.116	0.095	6	37	Neg.	Grey zone
Sample 1 GD1a	1.117	0.574	61	23	Pos.	Neg.
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 IgM: synthetic „MAG“								
Sample	Lot L15AB				Lot L24AD			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Mean [Ratio]	65.8	78.9	155.0	152.9	68.6	88.4	182.6	171.1
SD [Ratio]	4.5	7.6	5.2	7.3	10.3	7.2	17.2	19.4
CV [%]	6.9	9.6	3.4	4.7	15.0	8.2	9.4	11.3

Table 9

Enzyme label IgG/ IgM										
Ganglio sides	GM1	GM1	GM2	GM2	GD1a	GD1a	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b
Sample	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	86	156	72	192	124	264	110	310	286	84
SD [Ratio]	1.2	2.5	5.2	1.2	4.8	2.0	2.0	4.0	4.6	1.9
CV [%]	2.9	3.2	14.2	1.2	7.7	1.5	3.6	2.6	3.2	4.5

Table 10

APPENDIX I

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

Intra-Assay Precision (Within-Run)

Enzyme label IgG										
Ganglio sides	GM1	GM1	GM2	GM2	GD1a	GD1a	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b
Sample	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	59	82	49	115	72	153	139	111	89	222
SD [Ratio]	1.6	4.7	1.8	6.9	4.4	7.2	4.0	2.8	4.5	5.8
CV [%]	2.7	5.7	3.7*	6.0*	6.1	4.7	2.9	2.5	5.1	2.6

Table 11

Enzyme label IgM										
Ganglio sides	GM1	GM1	GM2	GM2	GD1a	GD1a	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b
Sample	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	79	87	43	152	122	103	56	142	72	74
SD [Ratio]	1.8	1.2	0.9	4.8	3.6	3.9	2.5	3.3	3.8	2.6
CV [%]	2.3	1.4	2.0	3.1	3.0**	3.8**	4.4	2.3	5.2	3.5

Table 12

Inter-Assay Precision (Between-Run)

Enzyme label IgM: synthetic "MAG"				
Lot 3317N				
Sample	1	2	3	4
Mean [Ratio]	106.0	115.1	176.1	173.6
SD [Ratio]	11.7	17.4	12.6	9.7
CV [%]	11.0	15.1	7.1	5.6

Table 13

Enzyme label IgG/IgM										
Ganglio sides	GM1	GM1	GM2	GM2	GD1a	GD1a	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b
Sample	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	74	184	138	176	224	92	96	306	92	262
SD [Ratio]	3.5	13.9	11.3	7.8	14.2	7.5	4.8	13.4	3.8	13.3
CV [%]	9.5	15.2	16.5	8.9	12.7	16.2	10.1	8.8	8.2	10.1

Table 14

Enzyme label IgG										
Ganglio sides	GM1	GM1	GM2	GM2	GD1a	GD1a	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b
Sample	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	52	84	45	118	44	139	109	140	42	204
SD [Ratio]	6.4	17.6	6.4	21.5	10.6	15.5	14.2	18.5	8.3	23.6
CV [%]	12.4	21.0	14.1*	18.2*	24.1	11.1	13.0	13.2	19.6	11.6

Table 15

Inter-Assay Precision (Between-Run)

Enzyme label IgM										
Ganglio sides	GM1	GM1	GM2	GM2	GD1a	GD1a	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b
Sample	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	102	63	47	120	112	65	154	46	171	63
SD [Ratio]	10.9	5.7	2.4	8.8	35.2	14.6	19.1	3.7	16.2	9.9
CV [%]	10.7	9.0	5.0	7.3	31.5**	22.6**	12.4	8.0	9.5	15.6

Table 16

*Auto-antibody/ isotype combination not described in the literature were not included in the final analysis.

**Auto-antibody/ isotype combination, which have not been shown to be of primary clinical relevance, were not included in the final analysis.

Functional Sensitivity

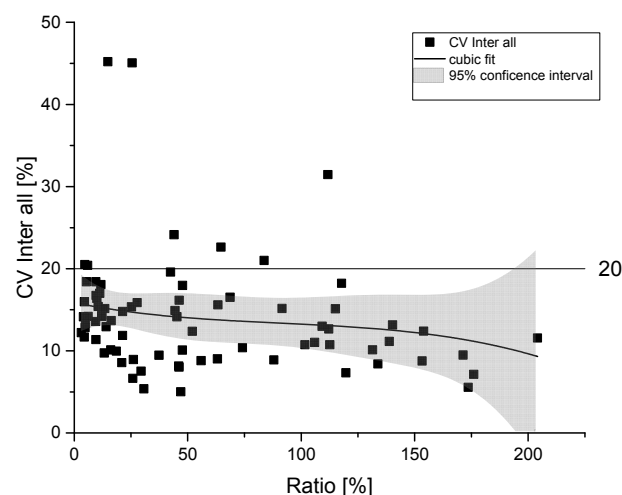


Figure 2

Linearity

Ganglio-sides	Enzyme label	Serum	Range measured	Linear range
"MAG"	IgM	Reg 83	3-81	3-75
		Reg 54	22-57	22-57
	IgG	SP69	7-94	7-94
		P II	9-181	17-175
		JJ	6-127	6-127
GM1	IgM	SP69	10-93	21-79
		SM1	14-148	26-114
			9-138	9-89
	Mix	SP69	16-173	30-128
		P II	16-302	16-302
GM2	IgM	SP69	14-218	22-178
		RL1739	8-110	13-102
GD1a	IgG	EP4076	4-88	4-88
		68-MA	14-111	14-111
	IgM	MS	7-106	17-103
GD1b	IgG	581-SP	5-99	5-99
		72 BR	14-163	14-148
	Mix	581-SP	18-264	18-176
GQ1b	IgG	MG	12-198	34-166
			18-228	18-228

Table 17

Method comparison for MAG “mimotope”

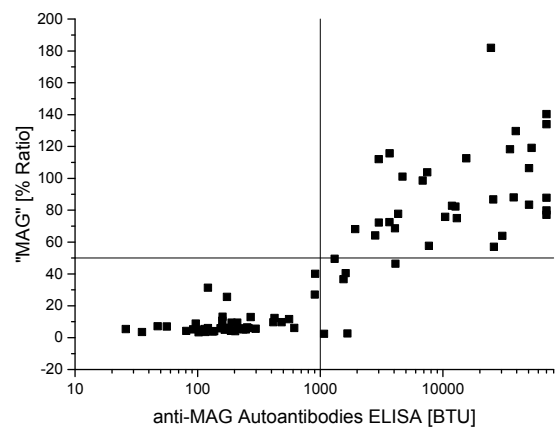


Figure 3A: The horizontal line indicates the 50 % ratio cut-off applied in the BÜHLMANN GanglioCombi™ ELISA tests. The vertical line indicates the 1000 BTU cut-off applied in the anti-MAG Autoantibody ELISA.

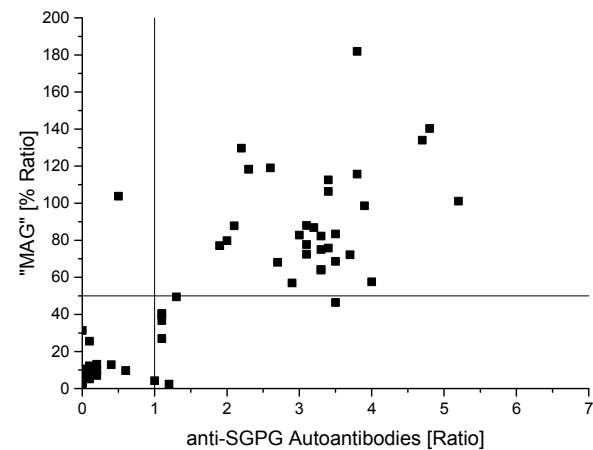


Figure 3B: The horizontal line indicates the 50 % ratio cut-off applied in the BÜHLMANN GanglioCombi™ ELISA tests. The vertical line indicates the cut-off value of 1 applied in the anti-SGPG Autoantibody ELISA.

Normal Blood Donors

Category	anti-Ganglioside and MAG autoantibodies (%)
	MAG, GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b
Negative	91-100
Greyzone	0-6
Positive	0-4
Strongly positive	0

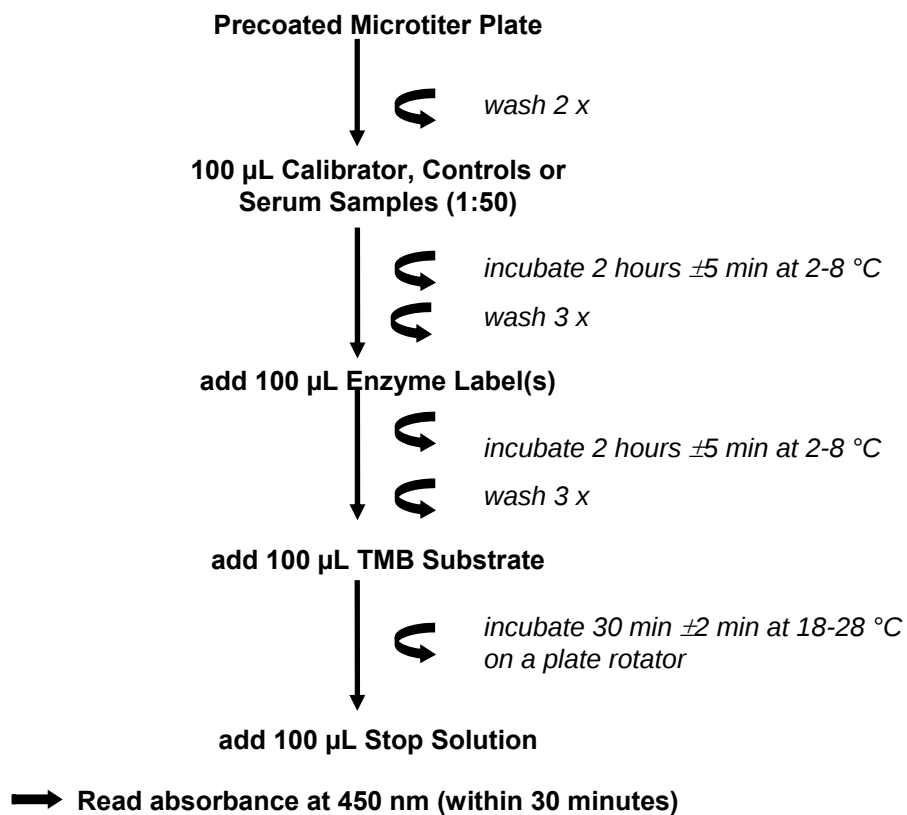
Table 18

Distribution frequency, of individual anti-Ganglioside- and MAG auto-antibodies (%) in normal blood donors (n = 100) detected with BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA assays, classified into titre categories. The results depict values for individual ganglioside-isotype (IgG/IgM mix, IgG or IgM) and MAG-IgM combinations

REFERENCES / REFERENZEN / RÉFÉRENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS

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™ MAG ELISA



TIME TO RESULT: 4.5 HOURS

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 Référence 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 sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenuto sufficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente para <n> tests
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso Leia cuidadosamente as instruções
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperature Limite 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 Tampone di lavaggio concentrato (x10) Tampón de lavado concentrado (x10) Concentrado de tampão de lavagem (x10)
BUF INC	Incubation Buffer Inkubationspuffer Tampon d'incubation Tampone di incubazione Tampón de incubación Tampão de incubação



Symbol	Explanation
CONTROL -	Negative Control Negativkontrolle Contrôle négatif Controllo negativo Control negativo Controle negativo
CONTROL L	Low Control Kontrolle tief Contrôle faible Controllo bsso Control bajo Control baixo
CONTROL M	Medium Control Kontrolle medium Contrôle moyen Controllo medio Control medio Control medio
CAL	Calibrator Kalibrator Calibrateur Calibratore Calibrador Calibrador
EL IgG	Enzyme Label IgG Enzymmarker-IgG Marqueur enzymatique IgG Marcatore enzimatico IgG Marcador enzimático de IgG Marcador enzimático IgG
EL IgM	Enzyme Label IgM Enzymmarker-IgM Marqueur enzymatique IgM Marcatore enzimatico IgM Marcador enzimático de IgM Marcador enzimático IgM
EL MIX	Enzyme Label IgG/IgM Mix Enzymmarker-IgG/IgM Mix Marqueur enzymatique IgG/IgM mix Marcatore enzimatico IgG/IgM 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 bloccante Solución de interrupción Solução stop



BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA is a trademark of BÜHLMANN Laboratories AG