



GanglioCombi

with Enzyme Label Mix IgG/IgM

**anti-Ganglioside Autoantibodies
ELISA**

(GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b, and GQ1b)

EK-GCO 96 wells
(12 patient profiles; IgG/IgM-Mix)

Revision date: 2010-08-11

ENGLISH

INTENDED USE

BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA, EK-GCO, is designed for the quantitative determination of the clinically most relevant IgG and IgM autoantibodies directed against GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b in human serum (IgG/IgM Mix) (1-8).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA is based on the enzyme-immunometric assay technique. Gangliosides GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b have stripwise been coated onto the wells of the microtiter plate. Calibrator, controls and patient sera are incubated for two hours in the microtiter wells and anti-ganglioside autoantibodies (Ab) present in the sample bind to the immobilized gangliosides. After washing off unbound substances, a horseradish-peroxidase (HRP) labeled antibody mix against human IgG and IgM is added to the wells and incubated for another two hours. Following a second washing step in which unbound antibody-enzyme reagent is removed, a substrate solution containing tetramethylbenzidine (TMB) is added to the wells. A blue color develops in proportion to the amount of anti-ganglioside autoantibodies bound to the microplate in the initial step. Color development is stopped by adding an acidic stop solution (diluted sulfuric acid) which turns the blue solution into yellow. The intensity of the color is measured at 450 nm.

The measured absorbance is proportional to the titer of anti-ganglioside antibodies present in a given sample. The titers of anti-ganglioside autoantibodies are expressed as ratios of the calibrator and can be assigned to titer categories.

BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA is designed to quantify autoantibodies of IgG and IgM isotype, both in the same test. (IgG/IgM-Mix-conjugate; 1 profile/patient).

For further differentiation of IgG or IgM isotypes (individual IgG- and IgM-conjugate), refer to EK-GCO-GM (2 profiles/patient).

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Microtiter Plate precoated with gangliosides	12 x 8 wells	B-GCO-MP	Ready to use
Plate Sealer	3 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10X) with preservatives	1 bottle 100 ml	B-GCO-WB	Dilute with 900 ml of deionized water
Incubation Buffer with preservatives	1 bottle 100 ml	B-GCO-IB	Ready to use
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 Mix Anti-human IgG and IgM Ab conjugated to HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 ml	B-GCO-ELGM	Ready to use
TMB Substrate TMB in citrate buffer with H ₂ O ₂	1 vial 11 ml	B-TMB	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	1 vial 11 ml	B-STs	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 1 month at 2-8°C. Do not freeze!
Controls	
Incubation Buffer	
Enzyme Label	Store at 2-8° until expiration date printed on the labels.
TMB Substrate	
Stop Solution	Store at 18-28°C.

Table 2

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Both, Calibrator (B-GCO-CA) and Controls (B-GCO-CONSET) of this kit contain components of human origin. Each serum donor unit used in the preparation of the components was tested by an FDA approved method and found negative for HBV surface antigen, so as for HCV and HIV1/2 antibodies. Although these methods are highly accurate, there is no guarantee that this material cannot transmit Hepatitis or AIDS. *Therefore, all patient specimens and kit components should be handled as if capable of transmitting infections.* All products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practice and using appropriate precautions.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes with disposable tips: 20 µl, 100 µl and 1 ml 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.
- Microtiter plate rotator.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- The procedure requires <0.1 ml of blood and <50 µl of serum, respectively.
- Refer to page 4 to learn about the interference of hemolyzed, lipemic or icteric samples.
- Collect blood into plain tubes (no anti-coagulant), avoid hemolysis, 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.

PROCEDURAL NOTES

Recommendations and caveat for performance

Results and outcome of the assay may be influenced by many factors. It is important to strictly follow the protocol and the pre-analytical requirements. In particular we recommend attending to the following steps:

- **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.
- **Steps 3-9:** Use cold (2-8°C) reagents for all these steps and keep them cold while pipetting.
- **Steps 3, 6, 9:** Make sure that the 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 microtiter plates during the incubation with substrate. Depending on the plate shaker, we recommend 400-600 rpm. The solution should be moved 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.

ASSAY PROCEDURE

1. **Dilute** all patient samples to be investigated 1:50 with Incubation Buffer. Use 30 µl of serum + 1470 µl of Incubation Buffer. Mix by vortexing and leave diluted samples and reconstituted calibrator and controls for 30 minutes at 2-8°C prior to pipetting (refer to step 4 a-c).
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 after usage**. Store refrigerated.

Note: Use cold reagents in steps 3 to 9.

3. **Wash** the coated wells twice using at least 300 µl of **cold** Wash Buffer per well. Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper to remove remaining liquid completely.

Note: Immediately proceed to the next step (4a-e).

- 4a. Calibrator: Pipet 100 µl of the Calibrator into the well A1 (refer to Figure 1).
- 4b. Controls: Pipet 100 µl of the Medium Control into well B1, Low Control into well A2 and Negative Control into the well B2 (refer to Figure 1).

Note: If more than three strips per run are used, Calibrator and Controls can be tested in duplicates (see Figure 1).

- 4c. Patient serum: Pipet 100 µl of diluted patient serum 1 into the wells C1 - H1 (refer to Figure 1).
 - 4d. Patient serum: Pipet 100 µl of diluted patient serum 2 into the wells C2 - H2 (refer to Figure 1)
 - 4e. Pipet 100 µl of diluted patient sera 3-12 into the subsequent wells (refer to Figure 1).
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 the 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.

7. Add 100 µl of **Enzyme Label Mix** to all wells.
 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 the 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: Let TMB Substrate Solution adjust to room temperature (18-28°C).**
10. Add 100 µl of TMB Substrate Solution to each well.
 11. Cover the plate with a Plate Sealer, incubate the plate on a **plate shaker** at 400-600 rpm incubate for 30 minutes ± 2 minutes at 18-28°C protecting the plate from direct light.
 12. Add 100 µl of **Stop Solution** to all wells. Proceed to step 13. within 30 minutes.
 13. Read the **absorbance** at 450 nm in a microtiter plate reader.

RESULTS AND CALCULATION

Standardization

The Calibrator included in this kit has been calibrated against internal reference material. It has been adjusted to **200 % ratio**.

Calculation of results:

1. Record the 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 the absorbance of samples and the (averaged) absorbance of the Calibrator

$$\% \text{ Ratio} = \frac{\text{absorbance of samples and Controls}}{\text{absorbance of Calibrator}} \times 200$$

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

Note: The results presented in Table 11 are examples. Calibrator and Controls must be used in each individual assay.

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.

All controls must be within established confidence ranges (% ratio). The confidence ranges of the Controls are lot-specific and printed on the QC data sheet delivered with this kit.

Performance characteristics should be within established limits. If these characteristics are not in conformity with established limits and repetition excludes handling failures, check the following issues: i) Have all reagents, used in step 3-9, 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) color of the TMB Substrate Solution (should be colorless) vii) purity of the water.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision (Within-Run): 4.2 %. The intra-assay precision was calculated from results of 12 values of two IgM and/or IgG samples in a single run. The results in Table 12 have been calculated as % ratio as described in "Results and Calculation".

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 12.0 %. The inter-assay precision has been determined by two measuring different serum samples with antibodies to 6 gangliosides in 20 different runs. The results in Table 13 have been calculated as % ratio as described in "Results and Calculation".

Analytical Sensitivity: 12 Incubation Buffer replicates were assayed in a single run. The detection limit expressed as the % ratio of the calibrator was calculated to be ≤ 10 %.

Functional Sensitivity: The inter- and intra-assay precision of serum samples between 9 to 338 % ratio was determined. The mean values and %CV were calculated for each sample. Figure 2 shows a polynomial X/Y plot of intra- and inter-assay precision vs. % ratio. The resulting curve was below the upper limit of 15% and 20% CV for intra and inter-assay precision, respectively, manifesting reliable results.

Linearity: The linear range of the test system was assessed according to CLSI guideline EP06-A. The system is linear in the diagnostic relevant range between 40 and 200% ratio. Results above 200% ratio are assessed clinically correct and can be diluted into the linear range by an additional 1:5/1:10 dilution.

Specificity: Different human serum samples containing specific anti-ganglioside IgM and/or IgG autoantibodies were incubated over night with the corresponding soluble antigen in different concentrations and subsequently tested in the BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA according to the assay procedure. Specificity of the autoantibody binding was demonstrated by inhibition with the corresponding antigen at concentrations between 1 and 100 µg/ml (data not shown).

INTERFERING SUBSTANCES

No interference is detected with the following substances up to the following concentrations: Triglycerides (Intralipid®): 3000 mg/dL; conjugated bilirubin: 60mg/dL; unconjugated bilirubin: 40 mg/dL and hemoglobin: 400 mg/dL.

EXPECTED VALUES AND CUT-OFF

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 titer categories are based on n=100 blood donors¹ (adult men and women between 18 to 70 years of age) and n=277 pathological samples². Sera were assayed for each of the six gangliosides (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b), according to the assay procedure. Results of normal blood donors are shown in Table 14.

Guidelines for the Use of Cut-off and Titer categories/ratios (%):

Category	Ratio (%)
Negative	< 30%
Grey zone	30-50%
Cut-off	50%
Positive	> 50-100%
Strongly Positive	> 100 %

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

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

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA dient zur direkten quantitativen Bestimmung von IgG- und IgM-Autoantikörpern gegen die wichtigsten Ganglioside GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b und GQ1b, in humanem Serum (IgG/IgM Mix) (1-8).

PRINZIP DER METHODE

Der vorliegende BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA Test ist ein enzym-immunometrischer Festphasenassay. Die Mikrotiterplatte wurde streifenweise mit den Gangliosiden GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b und GQ1b beschichtet. Der Kalibrator, die Kontrollen und Serumproben werden in den Mikroküvetten der Mikrotiterplatte 2 Stunden inkubiert und die vorhandenen Anti-Gangliosid-Autoantikörper binden an die immobilisierten Ganglioside. Durch Waschschrte werden die ungebundenen Substanzen entfernt. Danach wird ein Mischkonjugat von anti-human-IgG und anti-human-IgM Antikörpern (Ab) zugegeben, die mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert sind und weitere 2 Stunden inkubiert. Danach werden die ungebundenen Enzymkonjugat-Antikörper durch Waschen entfernt. Die Substratlösung, die Tetramethylbenzidin (TMB) enthält wird zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Durch die Enzymreaktion entsteht eine Blaufärbung, die durch Zugabe der sauren Stopplösung (verdünnte Schwefelsäure) beendet wird und einen Farbumschlag (gelb) bewirkt. Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung, ist proportional zur Konzentration der Autoantikörper in den Proben. Die Konzentration der anti-Gangliosid-Antikörper wird quantitativ als Verhältnis von der Probe zum Kalibrator angegeben (% Ratio). BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA (EK-GCO) wird zur quantitativen gleichzeitigen Bestimmung von Autoantikörpern vom Isotyp IgG und IgM (IgG/IgM Mix Konjugat) in einem Assay eingesetzt (1 Profil/Patient). Um IgG oder IgM Subtypen zu differenzieren, kann der Kit EK-GCO-GM eingesetzt werden (2 Profile/Patient).

GELIEFERTE REAGENZIEEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Mikrotiter-Platte Beschichtet mit Gangliosiden	8 x 12 Küvetten	B-GCO-MP	Gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Stück		
Waschpuffer Konzentrat (10x) Mit Konservierungsmitteln	1 Flasche 100 ml	B-GCO-WB	Mit 900 ml deionisiertem Wasser verdünnen
Inkubationspuffer Mit Konservierungsmitteln	1 Flasche 100 ml	B-GCO-IB	Gebrauchsfertig
Kalibrator lyophilisiert mit Konservierungsmitteln	1 Flasche	B-GCO-CA	Mit 1.5 ml Inkubationspuffer versetzen
Kontrollen Negativ, Tief und Mittel; lyophilisiert mit Konservierungsmitteln	3 Flaschen	B-GCO- CONSET	Mit 1.5 ml Inkubationspuffer versetzen
Enzymmarker-Mix Anti-human-IgG und -IgM Ab, gekoppelt mit HRP in einem Protein-basierten Puffer mit Konservierungsmitteln	1 Flasche 11 ml	B-GCO- ELGM	Gebrauchsfertig
TMB-Substrat in Zitrat-gepufferter H ₂ O ₂ - Lösung	1 Flasche 11 ml	B-TMB	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M Schwefelsäure	1 Flasche 11 ml	B-STs	Gebrauchsfertig Korrosiv

Table 3

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Zu verwenden bis zum Verfallsdatum angegeben auf der Verpackungsetikette. Lagerung bei 2-8°C.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Microtiter-Platte	Ungebrauchte Streifen sofort in die mit Dessikator versetzte Aluminiumpackung zurückbringen. Packung völlig schließen. Bis zu 4 Monate bei 2-8°C haltbar.
Waschpuffer	Zu verwenden bis 4 Monate nach der Rekonstitution. Bei 2-8°C lagern.
Kalibrator	Zu verwenden bis 1 Monat nach der Rekonstitution.
Kontrollen	Bei 2-8°C lagern. Nicht einfrieren!
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.

Table 4

WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Kalibrator (B-GCO-CA) und Kontrollen (B-GCO-CONSET) enthalten Komponenten humaner Herkunft. Jedes einzelne Spenderserum wurde durch von der FDA genehmigte Methoden auf HBV Oberflächen Antigen, HCV und HIV1/2 Antikörper getestet, und als negativ freigegeben. Trotz hoher Genauigkeit dieser Methoden kann nicht garantiert werden, dass die Materialien nicht Hepatitis oder AIDS übertragen können. *Aus diesem Grunde müssen diese Kit Komponenten, sowie die Patientenproben als potentiell infektiös betrachtet werden.* Alle Produkte, die humanes Material enthalten, müssen mit größter Vorsicht und nach den Vorgaben der guten Labor Praxis (GLP) verarbeitet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten für 20 µl, 100 µl und 1 ml.
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Vorbereitung der Verdünnungsproben.
- 1000 ml Zylinder zur Verdünnung des Waschpuffers.
- Mikrotiter-Platten-Waschgerät oder Spritzflasche für Waschpuffer.
- Saugfähiges Papier
- Mikrotiter-Platten-Schüttler.
- Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter (450 nm).

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

- Dieser Test benötigt <0.1 ml Blut oder <50 µl Serum.
- Interferenzen hämolytischer lipämischer oder ikterischer Proben wurden untersucht und auf Seite 7 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 das Serum abgiessen.
- Für die Probenlagerung empfehlen wir die Herstellung von Aliquots um wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden. Für bis zu 4 Monate können die Serumproben bei ≤ -20°C gelagert werden. Für die längerfristige Lagerung empfehlen wir die Lagerung bei -70°C (Probenstabilität >1 Jahr). Proben sollten vor dem Gebrauch aufgetaut und durch gründliches Vortexen gut gemischt werden.

TECHNISCHE HINWEISE

Empfehlung für die Test Durchführung

Die Testresultate und deren Auswertung kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Die strikte Einhaltung der vorgeschriebenen Testdurchführung und der Präanalytik, insbesondere der folgenden Schritte wird empfohlen:

- Auf Grund des Produktionsprozesses kann es Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten haben. Sie werden mit dem ersten Waschschrift entfernt und haben keinen Einfluß auf die Ergebnisse.
- Schritt 3-9: Auf 2-8°C gekühlte Reagenzien sollen in allen diesen Schritten verwendet werden und sie sollen während des Pipettierens kalt gehalten werden.
- Schritte 3, 6, 9: Die Kavitäten müssen nach dem letzten Waschzyklus vollständig entleert werden.
- Schritt 9: Das verwendete TMB Substrat muss auf Raumtemperatur (18-28°C) gebracht werden.
- Schritt 11: Während der Substratinkubation muss die Platte geschüttelt werden. Die angegebenen rpm (400-600) können nicht direkt auf jeden Schüttler übertragen werden. Die Lösung in den Kavitäten soll in Bewegung gebracht werden, darf aber nicht überschwapen.
- Wird ein **Waschautomat** eingesetzt, soll der sogenannte „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass das Einfüllen des Waschpuffers erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor das Absaugen gestartet wird.

ARBEITSANLEITUNG

1. Patientenproben mit Inkubationspuffer 1:50 verdünnen (z.B. 30 µl Serum + 1470 µl Inkubationspuffer), mit dem Vortexer gut mischen und anschliessend, vor dem Pipettierschritt 4 a-c, die verdünnten Proben, den rekonstituierten Kalibrator und die Kontrollen 30 Minuten lang bei 2-8° C äquilibrieren.
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. Mikroküvetten zweimal mit jeweils ≥ 300 µl **kalt**em Waschpuffer waschen. Waschpuffer dekantieren und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen.

Hinweis: Setzen Sie den Ansatz sofort mit dem nächsten Schritt (4a-e) fort.

- 4a. 100 µl Kalibrator in die Mikroküvette A1 pipettieren.
- 4b. 100 µl Kontrolle Medium in die Mikroküvette B1, 100 µl Kontrolle Low in die Mikroküvette A2 und 100 µl Kontrolle Negative in B2 pipettieren (siehe Figure 1).
- 4c. 100 µl Serumprobe 1 in die Mikroküvetten C1-H1 pipettieren (siehe Figure 1).

HINWEIS: Falls mehr als drei Streifen pro Ansatz benutzt werden, können Kalibrator und Kontrollen als Doppelwert in die übrigenbleibenden Mikroküvetten der Reihen A und B pipettiert werden.

- 4d. 100 µl Serumprobe 2 in die Mikroküvetten C2-H2 pipettieren (siehe Figure 1).

4e. 100 µl Serumproben 3-12 in die nächsten Mikroküvetten pipettieren, so wie es in Figure 1 dargestellt ist.

5. Mikrotiterplatte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden $\pm$ 5 Minuten bei 2-8°C inkubieren (ohne Benutzung eines Plattenschüttlers).
6. Abdeckfolie entfernen, die Mikroküvetten entleeren und dreimal mit jeweils ≥ 300 µl **kalt**em Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen.
7. 100 µl **Enzymkonjugatlösung** zu jeder Mikroküvette zugeben.
8. Mikrotiterplatte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden $\pm$ 5 Minuten bei 2-8°C inkubieren. Die Inkubation soll nicht auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler erfolgen.
9. Abdeckfolie entfernen, die Mikroküvetten entleeren und dreimal mit jeweils ≥ 300 µl **kalt**em Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

Wichtig: TMB-Substratlösung auf 18-28°C äquilibrieren.

10. 100 µl **TMB-Substratlösung** zu jeder Mikroküvette zugeben.
11. Mikrotiterplatte mit Abdeckfolie abdecken und 30 $\pm$ 2 Minuten bei 18-28°C auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 400-600 rpm inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.
12. 100 µl **Stopplösung** zu jeder Mikroküvette zugeben und Luftblässchen mit Pipettenspitzen entfernen.
13. Messen der optische Dichte bei 450 nm innerhalb der nächsten 30 Minuten.

RESULTATE

Standardisierung

Der Kalibrator von BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA ist gegen eine interne Referenz kalibriert, die auf 200 % Ratio eingestellt ist.

Auswertung:

1. Optische Dichte aller Mikroküvetten (Kalibrator, Kontrollen und Patientenproben) bei 450 nm messen.
2. Mittelwert aus den Doppelmessungen kalkulieren (falls möglich).
3. Resultate werden als Verhältnis zwischen der Absorption der gemessenen Probe und der Absorption des Kalibrators (Mittelwert) angegeben:

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

Ein Auswerteprogramm zur Ermittlung der % Ratios ist auf den meisten Mikrotiterplatten-Readern vorhanden.

Table 11 zeigt typische Messwerte für den BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA. Die Daten dienen nur als Beispiel. Die Absorptionswerte des Kalibrators und der Kontrollen müssen bei jeder Testdurchführung neu ermittelt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich (% Ratio) liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und auf dem zusätzlichen Kontrollblatt 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) Pipetten, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, iii) Photometer Eichung, iv) Verfallsdaten der Reagenzien, v) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, vi) die TMB Substratlösung sollte farblos sein, vii) Wasserreinheit.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay-Präzision (Within-Run): 4.2 %. Die Intra-Assay-Präzision wurde aus 12 Werten von zwei IgM und/oder IgG positiven Proben im gleichen Ansatz bestimmt. Die Ergebnisse sind in Table 12 als % Ratio angegeben.

Inter-Assay-Präzision (Run-to-Run): 12.0 %. Die Inter-Assay-Präzision wurde durch die Messung von zwei verschiedenen Serumproben mit allen sechs Gangliosiden in 20 verschiedenen Ansätzen bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Table 13 als % Ratio angegeben.

Analytische Sensitivität: Zwölf Tests mit Inkubations-Puffer wurden im gleichen Ansatz für sämtliche Ganglioside durchgeführt. Die Nachweisgrenze, ausgedrückt als % Ratio zum Kalibrator, wurde berechnet, und liegt ≤ 10 %.

Funktionelle Sensitivität: Die Inter- und Interassaypräzision von Serumproben zwischen 9 und 338 % Ratio wurde bestimmt. Der Mittelwert und der Variationskoeffizient (%) wurde für jede Probe bestimmt. Abbildung 2 zeigt einen polynomischen X/Y-Plot indem Intra- und Interassaypräzision jeweils gegen die % Ratio aufgetragen wurden. Die resultierende Kurve liegt unterhalb der oberen Grenze von 15 bzw. 20 % für die Intra- respektive Interassaypräzision. Dies zeigt, dass mit dem Assay verlässliche Resultate erzielt werden (Figure 2, Seite 17).

Linearität des Testsystems: Die Linearität des Testsystems wurde ermittelt gemäss der CLSI Richtlinien EP06-A. Das System ist linear in dem diagnostisch relevanten Bereich zwischen 40 and 200% Ratio. Ergebnisse oberhalb von 200% Ratio werden klinisch korrekt klassifiziert und können durch zusätzliche Verdünnungen (1:5/1:10) in den linearen Bereich hinein verdünnt werden.

Spezifität: Verschiedene Patientenseren mit spezifischen anti-Gangliosid- IgM und/oder IgG- Autoantikörper wurden über Nacht mit dem entsprechenden gelösten Antigen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und danach im BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA getestet. Die Spezifität der Autoantikörperbindung für ein spezifisches Autoantigen wurde gezeigt durch die Inhibierung mit dem entsprechenden Antigen zwischen 1 und 100 µg/ml. (Daten nicht gezeigt).

INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Serum Indices: Für die folgenden Substanzen wurden bis zu den aufgeführten Konzentrationen keine Interferenzen festgestellt: **Triglyzeride (Intralipid®)** 3000 mg/dL; **Konjugiertes Bilirubin** 60 mg/dL, **unkonjugiertes Bilirubin** 40 mg/dL oder **Haemoglobin** 400 mg/dL.

ERWARTETE WERTE UND CUT-OFF RATIO

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

Die Werte wurden auf Grundlage einer Auswertung von n=100 Blutspendern¹ (Männer und Frauen zwischen 18 und 70 Jahren) und n=277 Proben von Patienten mit pathologischen Befunden² ermittelt. Die Seren wurden auf jeden der 6 Gangliosid-Antikörper (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b und GQ1b) entsprechend der Arbeitsvorschrift analysiert. Die Resultate der Blutspender sind in Table 14 dargestellt.

Richtwerte für die Beurteilung der Ergebnisse:

Kategorie	Ratio (%)
Negativ	<30 %
Grauzone	30-50 %
Cut-off	50 %
Positiv	>50-100 %
Stark positiv	>100 %

¹) Erhalten vom Blutspendezentrum der Universität Basel

²) Erhalten vom Friedrich-Baur-Institut, der Ludwig-Maximilians-Universität München, Neurologie der Universität Basel und von der Neurologischen Klinik, Universität Lyon.

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA a été conçue pour la détermination des taux sériques d'auto-anticorps IgG et IgM, les plus importants, dirigés contre les gangliosides GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b et GQ1b (IgG/IgM Mix) (1-8).

PRINCIPE DU DOSAGE

Le test de dosage BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA est basé sur une méthode immuno-métrique de type "sandwich" amplifiée par une réaction enzymatique. Les gangliosides GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b et GQ1b ont été coatés successivement sur une microplaque. Les échantillons sériques à tester ainsi que le calibrateur et les contrôles sont incubés dans la microplaque durant deux heures. Les auto-anticorps anti-gangliosides présents sont liés aux gangliosides coatés. Après l'élimination par lavage des molécules non-liées, un mix d'anticorps (Ac) dirigés contre les IgG et IgM humaines conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) est ajouté aux puits et la microplaque est incubée une nouvelle fois durant deux heures. Après un second lavage, ayant pour but d'éliminer les anticorps marqués non-liés, le substrat TMB (tétraméthylbenzidine) est ajouté, induisant une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-gangliosides initialement liés. La réaction de coloration est arrêtée par l'ajout d'une solution stop acide faisant passer la couleur du bleu au jaune. L'intensité de la coloration est déterminée par la mesure de l'absorption à 450 nm. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-gangliosides présents dans les échantillons. Les taux d'anticorps anti-gangliosides sont exprimés quantitativement à l'aide d'un calibrateur.

BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA (EK-GCO) est conçue pour quantifier les auto-anticorps d'isotypes IgG et IgM ensemble (IgG/IgM Mix) (1 profil/patient). Pour une différenciation spécifique des isotypes IgG et IgM, se référer à EK-GCO-GM (2 profils/patient).

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque Coatée (gangliosides)	12 x 8 puits	B-GCO-MP	Prête à l'emploi
Film adhésif	3 pièces		
Tampon de lavage, Concentré (10x) avec agents de conservation	1 flacon 100 ml	B-GCO-WB	A reconstituer avec 900 ml d'eau déionisée
Tampon d'incubation avec agents de conservation	1 flacon 100 ml	B-GCO-IB	Prêt à l'emploi
Calibrateur lyophilisé et avec agents de conservation	1 flacon	B-GCO-CA	A reconstituer avec 1.5 ml de tampon d'incubation
Contrôles négatif, bas, moyen lyophilisés et avec agents de conservation	3 flacons	B-GCO-CONSET	A reconstituer avec 1.5 ml de tampon d'incubation
Marqueur enzymatique Ac anti-IgG et anti-IgM humaines conjugués à HRP dans un tampon protéique avec agents de conservation	1 flacon 11 ml	B-GCO-ELGM	Prêt à l'emploi
Substrat TMB TMB dans un tampon citrate avec H ₂ O ₂	1 flacon 11 ml	B-TMB	Prêt à l'emploi
Solution Stop acide sulfurique 0.25 M	1 flacon 11 ml	B-STs	Prête à l'emploi Corrosif

Table 5

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 pendant 4 mois à 2-8°C.
Tampon de lavage	Stable durant 4 mois à 2-8°C.
Calibrateur	Stable durant 1 mois à 2-8°C. Ne pas congeler!
Contrôles	Stables durant 1 mois à 2-8°C. Ne pas congeler!
Tampon d'incubation	Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette
Marqueur enzymatique	
Substrat TMB	
Solution Stop	Stable à 18-28°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette

Table 6

RECOMMANDATIONS ET PRECAUTION D'EMPLOI

Le calibrateur (B-GCO-CA) et les contrôles de cette trousse (B-GCO-CONSET) contiennent des composants d'origine humaine. Chaque unité sérique de donneur utilisée dans la préparation des réactifs de la trousse a été testée par une méthode approuvée par la FDA et a été séronégative pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) et pour les anticorps anti-VIH1/2. Cependant, bien que ces méthodes soient très fiables, il ne peut être garanti que ce matériel ne puisse transmettre une hépatite B ou le SIDA.

En conséquence, tous les échantillons ainsi que les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux. Tous les produits contenant du matériel d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire et en respectant les précautions d'usage.

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision de 20 µl, 100 µl et 1 ml avec pointes jetables.
- Tubes en polystyrène ou polypropylène jetables, pour la préparation des dilutions.
- Eprouvette graduée de 1000 ml pour la préparation de la dilution du tampon de lavage.
- Laveur automatique de microplaques ou pissette pour le tampon de lavage.
- Papier absorbant.
- Agitateur de microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

- La procédure requiert <0.1 ml de sang ou <50 µl de sérum.
- Se référer à la page 10 pour les informations sur les interférences d'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'aliqoter 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.

REMARQUES TECHNIQUES

Recommandations et Mises en garde

Les résultats et le devenir de l'expérience peuvent être influencés par plusieurs facteurs. Il est recommandé de respecter strictement le protocole et ses aspects pré-analytiques. En particulier, nous recommandons de suivre les étapes suivantes:

- **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.
- **Étapes 3-9:** Utiliser des réactifs réfrigérés (2-8°C) pour toutes ces étapes et les conserver réfrigérés durant le pipetage.
- **Étapes 3, 6, 9:** S'assurer de vider les puits complètement 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 les microplaques durant l'incubation avec le substrat. Les rpm données (400-600) ne s'appliquent pas à tous les agitateurs de microplaques. La solution doit s'agiter dans les puits mais sans déborder.
- Pour les **laveurs automatiques**, BÜHLMANN utilise le mode "plate mode" i.e. chaque étape du processus (distribution ou "dispense") est réalisée séquentiellement pour toutes les barrettes, avant de procéder à l'étape suivante du processus (aspiration).

PROCEDURE

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). 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-c.
2. Préparer une microplaque avec suffisamment de barrettes pour tester le nombre désiré d'échantillons. 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.

4. 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 (4a-e).

- 4a. Distribuer 100 µl de calibrateur dans le puits A1 (voir Figure 1).
- 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 1).

Important: Si plus de trois barrettes sont utilisées par essai, distribuer calibrateur et contrôles en duplicata dans les puits de contrôle restants aux rangées A et B. (voir Figure 1).

- 4c. Distribuer 100 µl de sérum dilué du patient No. 1 dans les puits C1 à H1.
- 4d. Distribuer 100 µl de sérum dilué du patient No. 2 dans les puits C2 à H2 (voir Figure 1).
- 4e. Distribuer 100 µl de sérum dilué du patient No. 3 à 12 dans les puits suivants (voir Figure 1).
5. Couvrir la plaque à l'aide du film adhésif fourni et incubé à 2-8°C pendant 2 heures $\pm$ 5 minutes. Il n'est pas nécessaire d'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. Vider les puits et les sécher en tapant la microplaque sur du papier absorbant afin d'éliminer complètement le tampon de lavage.
7. Ajouter 100 µl de **marqueur enzymatique** dans chaque puits.
8. Recouvrir la plaque à l'aide d'un nouveau film adhésif et incubé à 2-8°C pendant 2 heures $\pm$ 5 minutes. Il n'est pas nécessaire d'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**. Vider les puits et les sécher en tapant la microplaque sur du papier absorbant.

Important: Laisser la solution de substrat atteindre une température de 18-28°C.

10. Ajouter 100 µl de **solution de substrat** dans chaque puits.
11. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif puis l'incuber sur un agitateur de microplaque à 400-600 rpm à 18-28°C durant 30 $\pm$ 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.

RESULTATS

Standardisation

Le calibrateur de la trousse BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA des LABORATOIRES BÜHLMANN a été calibré à l'aide d'une référence interne qui a été ajustée à **200 %**.

Calculation des résultats :

1. Mesure de l'absorbance (OD) de chaque puits à 450 nm (contrôles et échantillons de patient).
2. Calcul de la moyenne des deux valeurs obtenues (si les mesures sont réalisées en duplicata).
3. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'absorbance de l'échantillon et contrôles par rapport à l'absorbance moyenne du calibrateur:

$$\% \text{ Rapport} = \frac{\text{absorbance des échantillons, contrôles}}{\text{absorbance du calibrateur}} \times 200$$

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

Remarque: Les résultats présentés dans la Table 11 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.

CONTROL QUALITE

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail 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-ganglioside commercialement disponible, nous recommandons l'utilisation d'un pool de sérums positifs comme référence de contrôle de qualité interne.

Tous les contrôles doivent avoir une valeur comprises entre les limites de confiance établies. Les limites de confiance des contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont indiquées sur la feuille de contrôle contenue dans chaque trousse.

Les caractéristiques de performance devraient être comprise 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) pureté de l'eau.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision Intra-essai (Within-Run): 4.2 %. Elle a été calculée à partir des résultats de 12 valeurs de 2 échantillons lors d'un même essai. Les résultats sont reportés dans la Table 12 sous forme de rapport (%) d'après la formule citée plus haut.

Précision Inter-essais (Run-to-Run): 12.0 %. Elle a été déterminée en mesurant deux différents échantillons pour les 6 gangliosides au cours de 20 essais différents. Les résultats sont reportés dans la Table 13 sous forme de rapport (%) d'après la formule citée plus haut.

Sensibilité analytique: 12 réplicats de tampon d'incubation furent mesurés au cours d'un même essai. La limite de détection exprimée en % par rapport au calibrateur se trouve $\leq 10\%$.

Sensibilité fonctionnelle: La précision intra- et inter-essais d'échantillons de sérum entre 9 et 338 % rapport a été déterminée. La valeur moyenne et le CV en % ont été calculés pour chaque échantillon. La Figure 2 représente une interpolation polynomial x/y des précisions intra- et inter-essais contre le % rapport. La courbe, qui en résulte, se situe au-dessous la limite supérieure de 15% (intra-essai) et 20% (inter-essais) indiquant ainsi des résultats fiables.

Linéarité du test: Le domaine de linéarité du test a été déterminé conformément à la directive EP06-A du CLSI. Le test est linéaire entre 40 et 200 % rapport, le domaine diagnostique relevant. Les résultats au-dessus de 200 % rapport sont correctement analysés d'un point de vue clinique et peuvent être dilués dans le domaine de linéarité par une dilution supplémentaire au 1:5 / 1:10.

Spécificité: Différents échantillons sériques de patients présentant des auto-anticorps anti-ganglioside spécifiques, IgM et/ou IgG furent incubés durant une nuit avec l'antigène soluble correspondant en concentrations différentes et analysés ensuite au moyen de la procédure BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA. La spécificité des auto-anticorps anti-gangliosides a été démontrée à l'aide de tests d'inhibition par les antigènes correspondants employés à des

concentrations comprises entre 1 et 100 µg/ml (données non reportées).

INTERFERENCES

Indices Sériques: Aucune interférence n'a été observée avec les substances suivantes à la concentration indiquée: **Triglycérides (Intralipid®)** 3000 mg/dL; **bilirubine conjuguée** 60 mg/dL, **bilirubine non conjuguée** 40 mg/dL et **hémoglobine** 400 mg/dL.

VALEURS DES REFERENCES ET RAPPORTS (%)

En accord avec les institutions mentionnées ci-dessous, nous avons établi un « cut off » (valeur seuil) clinique de 50 %. Les valeurs inférieures à 30 % doivent clairement être considérées comme négatives. Les valeurs des rapports ont été obtenues à partir des résultats de n=100 échantillons de donneurs de sang normaux asymptomatiques (adultes de sexe masculin et féminin, âges compris entre 18 et 70 ans)¹⁾ et n=277 échantillons pathologiques²⁾. Les sérums ont été testés pour chacun des six gangliosides (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b et GQ1b), conformément à la procédure d'utilisation du test. Les résultats des donneurs de sang sont présentés dans la Table 14.

Guide d'interprétation des rapports :

Catégorie	Rapport (%)
Négatif	< 30 %
Zone grise	30 – 50 %
Cut-off	50 %
Positif	> 50-100 %
Fortement positif	> 100 %

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

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

USO

Il BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA è un test quantitativo per la determinazione degli autoanticorpi più importanti IgG ed IgM presenti nel siero umano diretti verso GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b e GQ1b (IgG/IgM Mix) (1-8).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il dosaggio BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA utilizza la tecnica degli immunodosaggi di tipo sandwich amplificati enzimaticamente. Per ogni strip i gangliosidi GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b e GQ1b sono singolarmente pre-coattati in ogni pozzetto. Il calibratore, i controlli ed i sieri dei pazienti vengono incubati per due ore nei pozzetti della micropiastra e gli autoanticorpi antiganglioside (Ab) presenti vengono legati dai gangliosidi adesi. Dopo lavaggio delle sostanze non legate una miscela d'anticorpi marcati con perossidasi di rafano (HRP) vs gli anticorpi IgG ed IgM viene aggiunta ai pozzetti ed incubata per altre due ore. A seguito di un secondo lavaggio per eliminare il reagente anticorpo-enzima non legato, viene aggiunta una soluzione di substrato contenente tetrametilbenzidina (TMB) ai pozzetti. Si sviluppa una colorazione blu in proporzione al quantitativo di autoanticorpi antiganglioside legati nello step iniziale. Lo sviluppo della colorazione viene bloccato aggiungendo una soluzione bloccante a base di acido che trasforma la colorazione blu in gialla. L'intensità dell'assorbanza del colore è misurata a 450 nm. L'assorbanza misurata è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi antigangliosidi presenti in un dato campione. I titoli degli autoanticorpi antigangliosidi sono espressi come rapporto di un calibratore di riferimento (rapporto percentuale).

BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA (EK-GCO) è concepito per la quantificazione di anticorpi isotipi IgG e IgM (IgG/IgM, coniugato mix; 1 profilo per paziente).

Per ulteriori determinazioni degli anticorpi IgG o IgM (coniugato distinto per IgG e IgM) usare il kit EK-GCO-GM (2 profili per paziente).

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropiastra Pre-coattata con gangliosidi	12 x 8- pozzetti	B-GCO-MP	Pronta all'uso
Foglio per sigillare la piastra	3 fogli		
Tampone di lavaggio concentrato (10x) Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-GCO-WB	Diluire con 900 ml di acqua deionizzata
Tampone di incubazione Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-GCO-IB	Pronto all'uso
Calibratore Liofilo con conservanti	1 flacone	B-GCO-CA	Aggiungere 1.5 ml di tampone di incubazione
Controllo negativo, basso ed medio; Liofilo con conservanti	3 flaconi	B-GCO-CONSET	Aggiungere 1.5 ml di tampone di incubazione
Marcato enzimatico mix Anticorpi Anti- IgG ed IgM umane coniugati con HRP in un tampone a base proteica con conservanti	1 flacone 11 ml	B-GCO-ELGM	Pronto all'uso
Substrato di TMB in tampone citrato con H ₂ O ₂	1 flacone 11 ml	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione bloccante 0.25 M di acido solforico	1 flacone 11 ml	B-STs	Pronto all'uso agente corrosivo

Table 7

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti sigillati	
Tutti i componenti del kit non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sulle etichette.	
Reagenti Aperti/ Ricostituiti	
Micropiastra	Riporre immediatamente le strip non ancora utilizzate nella busta di alluminio che contiene essiccante e risigillarle. Conservare fino a 4 mesi a 2-8°C.
Tampone di lavaggio	Conservare fino a 4 mesi a 2-8°C.
Calibratore	Conservare fino ad 1 mese a 2-8°C. Non congelare!
Controlli	
Tampone di incubazione	Conservare a 2-8° fino alla data di scadenza indicata sulle etichette.
Marcato enzimatico	
Substrato di TMB	
Soluzione bloccante	Conservare a 18-28°C fino alla data di scadenza indicata sulla etichetta.

Table 8

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Il calibratore (B-GCO-CA) ed i controlli di questo kit (B-GCO-CONSET) contengono componenti di origine umana. Ciascun siero utilizzato nella preparazione dei componenti del kit è stato testato con un metodo approvato dall'FDA e trovato negativo per l'antigene di superficie dell'HBV, dell'HCV e per gli anticorpi anti-HIV1/2. Benché questi metodi siano altamente precisi, non vi sono garanzie che questo materiale non possa trasmettere l'epatite o l'AIDS. *Quindi, tutti i campioni ed i componenti del kit devono essere manipolati come se potessero trasmettere agenti infettivi.* Tutti i prodotti contenenti materiale d'origine umana devono essere manipolati secondo quanto previsto dalle buone pratiche di laboratorio e adottando idonee precauzioni.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso: 20 µl, 100 µl e 1 ml.
- Provette di polistirene o polipropilene monouso per la preparazione di diluizioni del campione.
- Beute da 1000 ml per la ricostituzione del tampone di lavaggio.
- Dispositivo manuale o automatico per il lavaggio / aspirazione della micropiastra.
- Carta blottante.
- Agitatore per micropiastra.
- Lettore per micropiastra per le misurazioni dell'assorbanza a 450 nm.

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 13.
- Prelevare il sangue in provette secche (senza anticoagulanti), centrifugare per 10 minuti a circa 1500 x g e separare il siero.
- BÜHLMANN raccomanda di aliquotare i campioni per evitare ripetuti cicli di congelamento / scongelamento. I campioni tenuti a ≤ -20°C sono stabili fino ad 4 mesi. Per periodi di conservazione più lunghi, (più di un anno) tenere i campioni a -70°C.
- I campioni congelati devono essere scongelati completamente, quindi vortexati prima dell'utilizzo.

NOTE PROCEDURALI

Raccomandazioni e precauzioni nella procedura

I risultati del dosaggio sono influenzati da molti fattori. È raccomandato seguire attentamente il protocollo e le indicazioni pre-analitiche. Si raccomanda particolare attenzione ai seguenti punti:

- **Residui rimasti nei pozzetti** sono causati dal processo di produzione. Questi residui vengono completamente eliminati dai lavaggi durante la procedura descritta e non compromettono in alcun modo i risultati. (fare riferimento al punto 3 delle istruzioni per l'uso).
- **Punto 3-9:** Utilizzare e mantenere i reagenti refrigerati (2-8°C) durante la dispensazione.
- **Punto 3, 6, 9:** Dopo l'ultimo ciclo di lavaggio delle strip, assicurarsi che i pozzetti siano completamente vuoti.
- **Punto 9:** Assicurarsi prima dell'uso che il substrato TMB raggiunga 18-28°C.
- **Punto 11:** Assicurarsi una buona agitazione della micropiastra durante l'incubazione con il Substrato TMB bene. A seconda del tipo di agitatore è consigliata una velocità 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, BÜHLMANN consiglia l'utilizzo della modalità: "plate mode"; dispensazione sequenziale in tutte le strip e successiva aspirazione.

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

1. Diluire tutti i campioni 1:50 con il tampone di incubazione (ad es.: 30 µl di siero + 1470 µl di tampone di incubazione). 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 4 a-c.
2. Preparare una piastra con strip a sufficienza per effettuare il numero di test necessari. Estirpare le strip in eccedenza dal supporto e risigillarle **immediatamente** nella busta insieme all'essiccante. Conservare refrigerato.

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

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

Importante: Procedere immediatamente con il punto 4 (a-e).

- 4a. Dispensare 100 µl del calibratore nel pozzetto A1 (vedi illustrazione di seguito).
- 4b. Dispensare 100 µl del controllo medio nel pozzetto B1, dispensare 100 µl del controllo basso nel pozzetto A2 e 100 µl del controllo negativo nel pozzetto B2 (vedi Figure 1).

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

- 4c. Dispensare 100 µl del siero diluito del paziente 1 nei pozzetti C1 - H1 (vedi Figure 1).
- 4d. Dispensare 100 µl del siero diluito del paziente 2 nei pozzetti C2 - H2 (vedi Figure 1).
- 4e. Dispensare 100 µl del siero diluito del paziente 3-12 nei pozzetti successivi come illustrato in Figure 1.

5. Coprire la piastra con un foglio protettivo e incubare per 2 ore $\pm$ 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** per pozzetto. Svuotare i pozzetti e blottarli su carta assorbente assicurandosi che i pozzetti siano completamente vuoti.
7. Aggiungere 100 µl di **marcato enzimatico** a tutti i pozzetti.
8. Coprire la piastra con il foglio protettivo ed incubare per 2 ore $\pm$ 5 minuti a 2-8°C. (Non occorre utilizzare agitatore per micropiastra).
9. Togliere ed eliminare il foglio protettivo. Svuotare i pozzetti e lavarli tre volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio **refrigerato** per pozzetto. Svuotare i pozzetti e blottarli su carta assorbente.

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

10. Aggiungere 100 µl del **substrato TMB** ad ogni pozzetto.
11. Sigillare la piastra con un foglio protettivo, collocare la piastra su un mixer settato a 400-600 rpm, proteggere la piastra dalla luce diretta ed incubare per 30 ± 2 minuti a 18-28°C.
12. Aggiungere 100 µl di **soluzione bloccante** ai pozzetti. Procedere al punto 13. entro 30 minuti.
13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastra.

RISULTATI

Standardizzazione

Il Calibratore del kit BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA è stato calibrato verso un pool di riferimento interno, ed è stato calibrato a **200 % rapporto**.

Calcolo dei risultati:

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

$$\% \text{ Rapporto} = \frac{\text{assorbanza del Campione, Controlli}}{\text{assorbanza del Calibratore}} \times 200$$

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

NOTA: Esempio di risultati: vedi Table 11. Questi risultati sono forniti a solo scopo dimostrativo. I valori dell'assorbanza del calibratore e dei controlli devono essere generati per ciascuna seduta analitica.

CONTROLLO DI QUALITA'

La piena comprensione di questa metodica è necessaria per un uso ottimale del prodotto. Risultati affidabili potranno essere ottenuti solo utilizzando tecniche di laboratorio precise (odierne linee guida GLP) e seguendo accuratamente le istruzioni contenute in questa metodica. Poiché non vi è nessun siero di controllo per gli anticorpi antigangliosidi, disponibili in commercio, raccomandiamo l'utilizzo di un pool di sieri positivi per il controllo di qualità interno. Tutti i controlli devono cadere entro i limiti di confidenza stabiliti. I limiti di confidenza per il calibratore ed i controlli sono lotto specifici e stampati sul foglio di lavoro in allegato.

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

i) Avete utilizzato reagenti refrigerati (2-8°C) durante il dispensazione? ii) Dispensazione, controllo della temperatura e dei dispositivi; iii) Settaggi del lettore ELISA; iv) Data di scadenza dei reagenti; v) Conservazione e condizioni di incubazione; vi) La soluzione di Substrato TMB deve essere incolore; vii) Purezza dell'acqua.

PRESTAZIONI DEL DOSAGGIO

Precisione intra-dosaggio: 4.2 %. La precisione del dosaggio è stata calcolata dai risultati di 12 valori di due campioni positivi IgM e/o IgG in un'unica seduta. I valori sono forniti in Table 12 come rapporto percentuale, (vedi sopra).

Precisione inter-dosaggio: 12.0 %. La precisione interdosaggio è stata determinata misurando due campioni diversi di siero con tutti e 6 i gangliosidi in 20 sedute diverse. I valori sono presentati come rapporto percentuale come riportato in Table 13.

Sensibilità analitica: Sono stati dosati 12 replicati de tampone di incubazione in un'unica seduta. Il limite di rilevazione espresso come rapporto percentuale del calibratore è stato calcolato $\leq 10\%$.

Sensibilità funzionale: E' stata determinata la precisione intra- ed inter-dosaggio di campioni di siero tra 9 e 338 ratio. In oltre sono stati calcolati il valori medi e il CV %. Figure 2 mostra un grafico polinomiale de la precisione intra- ed inter-dosaggio vs. il ratio percentuale. La curva è risultata essere al di sotto del limite di rilevazione superiore di 15 % e 20% di CV per la precisione intra- ed inter-dosaggio rispettivamente, indicando quindi risultati validi.

Linearità di test: è stata determinata in conformità al protocollo EP06-A CLSI. Il sistema è risultato essere lineare nel range di rilevanza clinica tra 40 e 200 % ratio. Risultati al di sopra del 200 % ratio sono valutati clinicamente corretti e possono essere diluiti restando nel range di linearità con una diluizione addizionale 1:5/ 1:10.

Specificità: Diversi campioni di siero contenenti autoanticorpi specifici antiganglioside IgM e/o IgG sono stati incubati overnight con l'antigene solubile corrispondente e successivamente testati col dosaggio BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA. La specificità del legame con l'anticorpo è stata dimostrata mediante l'inibizione dell'antigene corrispondente a concentrazioni tra 1 e 100 µg/ml (dati non presenti).

Interferenze

Parametri sierici: Nessuna interferenza è stata riscontrata per le seguenti sostanze alle concentrazioni elencate: Trigliceridi (Intralipid®) 3000 mg/dL, bilirubina coniugata 60 mg/dL, bilirubina libera 40 mg/dL ed emoglobina 400 mg/dL).

VALORI ATTESI E CUT-OFF

In cooperazione con le istituzioni di seguito, è stato stabilito un cut-off clinico del 50%. Valori $<30\%$ si possono classificare come decisamente negativi. Il rapporto percentuale del titolo è stato stabilito su $n=100$ donatori volontari¹ (uomini e donne adulti, tra i 18 e 70 anni) e $n=277$ sieri patologici². I sieri sono stati dosati per ogni singolo ganglioside (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b e GQ1b), secondo la procedura del test. I risultati dei donatori di sangue sono riportati in Table 14.

Linee guida per l'utilizzo di cut-off / titolo %:

Classificazione	Titolo %
Negativo	$< 30\%$
Zona grigia	$30 - 50\%$
Cut-off	50%
Positivo	$> 50-100\%$
Altamente positivo	$> 100\%$

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

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

USO PREVISTO

El enzimoimmunoanálisis BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA ha sido diseñado para realizar la cuantitativa determinación de los mas relevantes autoanticuerpos IgG e IgM de suero humano dirigidos contra GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b y GQ1b (IgG/IgM Mix) (1-8).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

El enzimoimmunoanálisis BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA utiliza la técnica de inmunoanálisis intercalado con amplificación enzimática. Se ha recubierto previamente una placa de microtitulación con gangliósidos GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b y GQ1b. El calibrador, los controles y sueros de los pacientes se incuban durante dos horas en los pocillos de microtitulación y los autoanticuerpos antigangliósidos presentes se unen a los gangliósidos inmovilizados. Después de eliminar con el lavado las sustancias no unidas, se añade a los pocillos una mezcla de anticuerpos contra IgG e IgM humanas marcados con peroxidasa de rábano (HRP) y se incuba durante dos horas más. Tras un segundo lavado para eliminar el reactivo anticuerpo-enzima no unido, se añade a los pocillos una solución sustrato que contenga tetrametilbenzidina (TMB). Se desarrolla una coloración azul proporcional a la cantidad de autoanticuerpos antigangliósidos unidos en el paso inicial. El desarrollo del color se detiene con la adición de una solución de interrupción ácida que vira la solución de color azul a amarillo. La intensidad de la absorbancia del color se mide a 450 nm.

La absorbancia medida es directamente proporcional a la concentración de autoanticuerpos antigangliósidos presentes en una muestra determinada. Las titulaciones de autoanticuerpos antigangliósidos se expresan como cocientes de un calibrador (% cociente).

BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA (EK-GCO) ha sido diseñado para la cuantificar autoanticuerpos de isotipos IgG e IgM ensieme (IgG/IgM, con conjugado mix); (1 perfil por paciente).

Para la determinación definitivamente de los isotipos IgG o IgM (conjugato individual IgG e IgM se usa el kit EK-GCO-GM (2 perfiles por paciente).

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Microplaca cubierta previamente con gangliósidos	12 x 8 pocillos	B-GCO-MP	Listo para usar
Sellador de placas	3 unidades		
Tampón de lavado concentrado con conservantes	1 botella 100 ml	B-GCO-WB	Diluir con 900 ml de agua desionizada
Tampón de incubación con conservantes	1 botella 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
Control negativo, bajo y medio Liofilizados con conservantes	3 viales	B-GCO-CONSET	Añadir 1,5 ml de tampón de incubación
Marcador de enzima Mezcla Anticuerpo anti-IgG e IgM humana conjugado con HRP en un tampón de proteínas con conservantes	1 vial 11 ml	B-GCO-ELGM	Listo para usar Solución verde
Sustrato de TMB TMB en tampón citrato con H ₂ O ₂	1 vial 11 ml	B-TMB	Listo para usar
Solución de interrupción Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 11 ml	B-STTS	Listo para usar Agente corrosivo

Table 9

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Todos los componentes del kit sin abrir son estables a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Microplaca	Guarde inmediatamente las tiras que no ha utilizado en la bolsa de aluminio que contiene los sacos desecantes y vuelva a cerrarla completamente por toda la cremallera. Almacénese hasta 4 meses a 2-8°C.
Tampón de lavado	Almacénese hasta 4 meses a 2-8°C.
Calibrador	Almacénese hasta 1 mes a 2-8°C. ¡ No lo congele!
Controles	
Tampón de incubación	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas
Marcador de enzima	
Solución sustrato	Almacénese a 18-28°C C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.
Solución de interrupción	

Table 10

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

El calibrador (B-GCO-CA) y los controles de este kit (B-GCO-CONSET) contienen componentes de origen humano. Todas las unidades donadas de suero usadas en la preparación de los componentes del kit han sido analizadas por un método aprobado por la FDA, dando resultados negativos para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y para los anticuerpos del virus de la hepatitis C y VIH1/2 (virus de inmunodeficiencia humana 1/2). Aunque estos métodos son extremadamente exactos, no se garantiza que este material no pueda transmitir hepatitis o SIDA. *Por consiguiente, todas las muestras de pacientes y todos los componentes del kit deben ser manipulados como si fueran susceptibles de transmitir infecciones.* Todos los productos que contengan material de origen humano deben ser manipulados de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio y tomando las precauciones adecuadas.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables: pipetas de 20 µl, 100 µl y 1 ml.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro de 1000 ml para la reconstitución del tampón de lavado.
- Botella flexible para el tampón de lavado o dispositivo automático de lavado y aspiración de placas de microtitulación.
- Papel secante.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- El procedimiento requiere <0,1 ml de sangre y <50 µl de suero.
- En cuanto a interferencias de muestras hemolizadas, lipémicas o ictericas referirse a página 16.
- Recoja la sangre en tubos limpios, evite la hemólisis, deje coagular durante una hora, centrifugue durante 10 minutos a unos 1500 x g y recoja el suero.
- Para l'almacenaje recomendamos preparar partes alícuotas de muestras para evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación. Almacene las muestras del suero en ≤ -20°C para a 4 meses. Para el almacenamiento de larga duración recomendamos -70°C (muestras que exhiben la estabilidad de >1 año).
- Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente con un agitador vortex antes de su uso.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

Recomendaciones y advertencias para el funcionamiento
Los resultados y el resultado del análisis se pueden influenciar por muchos factores. Terminantemente el pegarse al protocolo y a los aspectos preanalíticos se recomienda. En detalle recomendamos el atender a los pasos siguientes:

- Residuos en los pocillos se forman durante el proceso de la producción. Ellos están eliminados completamente durante lavar los pocillos y no tienen ninguna influencia a los resultados (véase a punto 3 de la instrucción de uso).
- Pasos 3-9: Utilice los reactivos refrigerados (2-8°C) en todos estos pasos y manténelos a 2-8°C mientras de pipetear.
- Pasos 3, 6 y 9: Cerciórese de vaciar los pocillos totalmente después del último ciclo que de lavado.
- Paso 9: Cerciórese de utilizar el sustrato de TMB que fue equilibrado a la temperatura ambiente (18-28°C).
- Paso 11: Agite las placas del microtitulación bien durante la incubación con el sustrato. Las RPM dadas (400-600) no solicitan cada rotor. La solución debe moverse en pocillos – evite salpicaduras.
- BÜHLMANN utilice una **lavadora de placa automatizada**, programada en "modo supuesto de placa" es decir que cada paso de proceso (dispense) se realiza en todas las tiras secuencialmente, antes de procesar al paso siguiente (aspiración).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Diluya todas las muestras del paciente 1:50 con el tampón de incubación (p.ej. 30 µl de suero + 1470 µl de tampón de incubación). Mezcle completamente con un agitador vortex y deje las muestras diluidas, el calibrador y los controles reconstituídos a 2-8°C durante 30 minutos (para equilibración) antes de pipetear en el paso 4 a-c.
2. Prepare una placa con tiras suficientes para probar el número deseado de muestras de pacientes. Retire las tiras sobrantes del soporte y guárdelas en la bolsa metalizada junto con los sacos desecantes **sin demora**. Almacénelo refrigerado.

Importante: utilice sólo reactivos fríos en los pasos 3 a 9.

4. Lave dos veces los pocillos recubiertos utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado **refrigerado** por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante para eliminar tampón de lavado completamente.

Importante: Sigue inmediatamente con los pasos 4a-e.

- 4a. Pipetee 100 µl del calibrador en el pocillo A1 (véase imagen más abajo).
- 4b. Pipetee 100 µl del control medio en el pocillo B1, pipetee 100 µl del control bajo en el pocillo A2 y 100 µl del control negativo en el pocillo B2 (véase Figure 1).

Importante: Si se usan más de tres tiras por prueba, pipetee calibrador y controles por duplicado en los pocillos de control restantes de las filas A y B (véase

Figure 1).

- 4c. Pipetee 100 µl del suero diluido del paciente 1 en los pocillos C1 - H1 (véase Figure 1).
- 4d. Pipetee 100 µl del suero diluido del paciente 2 en los pocillos C2 - H2 (véase Figure 1).

- 4e. Pipetee 100 µl del suero diluido del paciente 3-12 en los siguientes pocillos tal como se muestra en

Figure 1.

5. Cubra la placa con un sellador de placa e incube durante 2 horas ± 5 minutos a 2-8°C. No se agitan la placa.
6. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado **refrigerado** por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante para eliminar tampón de lavado completamente.
7. Añada 100 µl de **marcador de enzima** a todos los pocillos.
8. Cubra la placa con un sellador de placa e incube durante 2 horas ± 5 minutos a 2-8°C. No se agitan la placa.
9. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado **refrigerado** por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

Importante: Deje que la solución sustrato de TMB alcance 18-28°C.

10. Añada 100 µl de la solución **sustrato de TMB** a cada pocillo.
11. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 30 ± 2 minutos a 18-28°C.
12. Añada 100 µl de **solución de interrupción** a todos los pocillos. Continúe con el paso 13 al cabo de 30 minutos como máximo.
13. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS Y CÁLCULOS

Estandarización

El calibrador del kit BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA está calibrado frente a una reserva de referencia interna. El a sido ajustado a **200 % cocientes**.

Computación de los resultados:

1. Registre la absorbancia (OD) a 450 nm para cada pocillo (Calibrador, controles y muestras de pacientes).
2. Calcule el promedio de los valores duplicados del calibrador y de los controles (si estuvieran disponibles).
3. Los resultados se muestran como el cociente entre la absorbancia de las muestras y de los controles y la absorbancia (promedio) del calibrador (% cocientes):

$$\% \text{ Rapporto: } \frac{\text{absorbancia de las muestras, controles}}{\text{absorbancia del calibrador}} \times 200$$

Un programa para calcular % cocientes es disponible en la mayoría de los lectores de placas.

Importante: Podrá encontrar un ejemplo de los resultados en Table 11.

Los resultados sólo se muestran a modo de ejemplo. Se deben generar valores de absorbancia del calibrador y los controles para cada conjunto de muestras que se vaya a ensayar.

CONTROL DE CALIDAD

Es necesaria una completa comprensión de este prospecto para que el uso del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente este prospecto.

Dado que no hay suero de control para anticuerpos antigangliósidos disponible comercialmente, recomendamos el uso de una reserva de suero positivo para los controles de calidad internos.

Todos los controles deben encontrarse dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos adicional.

Las características de eficiencia deben encontrarse dentro de los límites establecidos. Si las características no se correlacionan con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) los reactivos estaban utilizado refrigerado a 2-8°C en los pasos 3-9? ii) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo iii) ajustes del lector de ELISA iv) fechas de caducidad de los reactivos v) condiciones de almacenamiento e incubación vi) la solución sustrato con TMB debe ser incolora vii) pureza del agua.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Precisión intra-ensayo (dentro de la prueba): 4.2 %. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 12 valores de muestras positivas a IgM y/o IgG en una única prueba. El ensayo se realizó con la mezcla de marcador de enzima (B-GCO-ELGM). Los valores se muestran en Table 12 como un cociente %, tal como se ha descrito antes.

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 12.0 %. La precisión inter-ensayo se ha determinado midiendo dos diferentes muestras de suero con los 3 gangliósidos y la mezcla de marcador de enzima (B-GCO-ELGM) en 20 pruebas diferentes. Los valores se muestran en

Table 13 como un cociente %, tal como se ha descrito antes.

Sensibilidad analítica: Se ensayaron 12 duplicados de tampón de incubación en una única prueba. El límite de detección, expresado como cocientes % del calibrador, se calculó ≤ 10 %.

Sensibilidad funcional: La precisión intra- y inter-ensayo se determinó a partir de muestras de siero entre 9 y 338 % cocientes. El medio del valor y el %CV se calculó para cada muestra. Figure 2 muestra un plot X/Y polinomial de la precisión intra- y inter-ensayo vs. % cocientes. La curva resultando ha sido debajo de 15 y 20% CV, repectivamente, indicando que los resultados son validos.

Linealidad del sistema: La linalidad del sistema ha sido evaluado segun directiva CLSI EP06-A. El sistema esta lineal entre 40 y 200 % cociente siendo la gama clinicamente lo mas importante. Resultados arriba de 200% cocientes estan determinado clinicamente correcto y puedan ser diluidos adentro de la gama lineal con una dilución additional 1:5/1:10.

Especificidad: Durante la noche se incubaron muestras de suero de diferentes pacientes que contenían autoanticuerpos específicos IgM y/o IgG anti-gangliósido con el antígeno soluble correspondiente y posteriormente se probaron en el ensayo BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA de acuerdo con el procedimiento del ensayo. L'especificidad del ligamento con autoanticuerpo fue muestrado mediante l'inibicion del antígeno específico entre 1 y 100 µg/ml (datos no mostrados).

INTERFERENCIAS

Parametros de suero: Ninguna interferencia estaba encontrada para las siguientes sustancias asta a las concentraciones siguientes: Trigliceridos (Intralipid®) 3000 mg/dL, **bilirrubina conjugata** 60 mg/dL, **bilirrubina no conjugada** 40 mg/dL o **hemoglobina** 400 mg/dL.

VALORES ESPERADOS Y PUNTO DE CORTE

Junto con las instituciones mencionadas abajo establecimos un punto de corte de 50 %. Valores < 30 % se pueden clasificar claramente como negativos.

El establecimiento de cocientes del título se basa en n=100 donantes de sangre ¹ (hombres y mujeres adultos entre 18 a 70 años de edad) y n=277 muestras patológicas².

Los sueros fueron probados para cada uno de los seis gangliósidos (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b y GQ1b), según el procedimiento de análisis. Los resultados de los donantes de sangre se muestran en la Table 14.

Línea de guía para el uso de los cocientes del atajo/título:

Categoría	Cocientes del título (%)
Negativo	< 30 %
Zona gris	30 – 50 %
Cut-off	50 %
Positivo	> 50-100 %
Fuertemente positivo	> 100 %

¹ recogidos en el centro de donación de sangre, hospital de la Universidad de Basilea.

² recibidas del Friedrich-Baur-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich; Departamento de Neurología, Universidad de Basilea y Departamento de la Universidad de Neurología, Universidad Lyon.

Figure 1

**Microtiter plate set-up
IgG/IgM-Mix conjugate**

EK-GCO												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Calibrator	CAL	CAL	CTRL Low	CTRL Low								
CTRL	CTRL Med	CTRL Med	CTRL Neg	CTRL Neg								
GA1												
GM1												
GM2												
GD1a												
GD1b												
GQ1b												

12 patients / Kit (1 MP / Kit)

Table 11 **Example of Results**

B-GCO-ELGM	Absorbance (OD ₄₅₀)	Ratio [%]	Result
Calibrator	1.415		
	1.445		
Calibrator Avg.	1.430	200.0	
Medium Control	0.498	69.6	
	0.482	67.6	
Med. Control Avg.	0.490	68.6	
Low Control	0.195	27.2	
	0.191	26.8	
Low Control Avg.	0.193	27.0	
Negative Control	0.090	12.6	
	0.100	14.0	
Neg. Control Avg.	0.095	13.4	
Sample 1			
GA1 (well C)	0.119	17	Negative
Sample 1			
GM1 (well D)	0.544	76	Positive
Sample 1			
GM2 (well E)	0.106	15	Negative
Sample 1			
GD1a (well F)	0.162	45	Grey zone
Sample 1			
GD1b (well G)	0.745	104	Strongly positive
Sample 1			
GQ1b (well H)	0.090	13	Negative

Table 12 **Intra-Assay Precision (Within-Run)**

Ganglioside	Mean [% Ratio]	SD [% Ratio]	CV [%]
GA1	157	4.1	2.6
	170	5.8	3.4
GM1	85	2.4	2.9
	157	5.1	3.2
GM2	73	10.3	14.2
	193	2.4	1.2
GD1a	125	9.6	7.7
	264	4.0	1.5
GD1b	111	4.0	3.6
	310	7.9	2.6
GQ1b	287	9.2	3.2
	83	3.8	4.5
Mean			4.2

Table 13 **Inter-Assay Precision (Run-to-Run)**

Ganglioside	Mean [% Ratio]	SD [% Ratio]	CV [%]
GM1	95	17.1	18
	148	15.4	10.4
GA1	75	7.1	9.5
	183	27.8	15.2
GM2	137	22.7	16.5
	176	15.6	8.9
GD1a	224	28.4	12.7
	92	14.9	16.2
GD1b	95	9.6	10.1
	307	26.8	8.8
GQ1b	92	7.5	8.2
	263	26.6	10.1
Mean			12.0

Figure 2

Precision Profile

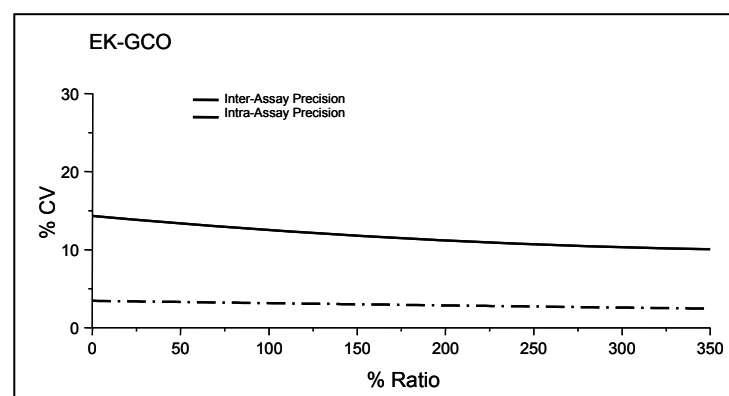


Table 14 **Blood Donors**

Category	anti-Ganglioside-autoantibodies (%)
	GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b
Negative	87-99
Greyzone	1-7
Positive	0-7
Strongly positive	0-1

Legend table 14: Distribution frequency of individual anti-Ganglioside-autoantibodies (%) tested with EK-GCO and classified into titer categories (n=100); calculated over gangliosides and isotypes:

Negative : 87-99 % of blood donors

Grey zone: 1-7% of blood donors

Positive: 0-7% of blood donors

Strongly positive: ≤1.0 % of blood donors

Table description: cf. "Results and Calculations", "Performance Characteristics", and "Expected Values and Cut-Off" (pages 3/4)

Tabellenbeschreibung: siehe "Resultate", „Leistungsmerkmale“ und "Normalbereich und Grenzwert" (Seite 6/7).

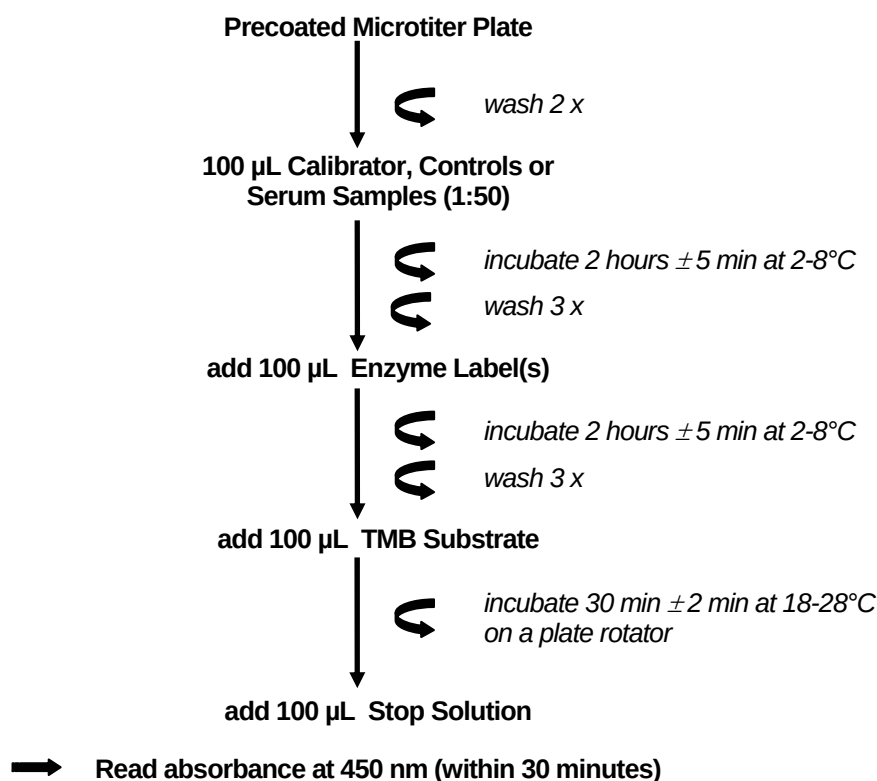
Explications relatives aux tableaux: voir "Résultats", "Caractéristiques de Performance" et "Valeurs Attendue et Cut-off" (page 9/10).

Descrizione tavola: cf. "Risultati e Calcolo", "Prestazioni del Dosaggio" e "Valori Attesi e Cut-off" (pagina 12/13).

Explicaciones relativas a las Tablas: ver "Resultados y Cálculos", "Características de Eficiencia" y "Valores esperados y Punto de Corte" (página 15/16).

1. Willison HJ and Yuki N: *Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies*. Brain 125, 2591-2625 (2002).
2. Latov N: *Antibodies to glycoconjugates in neurological disease*. Clin Aspects Autoimm 4, 18-29 (1990).
3. Pestronk A: Invited Review: *Motor neuropathies, motor neuron disorders, and antiglycolipid antibodies*. Muscle Nerve 14, 927-936 (1991).
4. Steck AJ: *Use of anti-glycoconjugate antibody assays in neuropathy*. Workshop presentation at the Nat. Meeting Am. Acad. Neurology, Seattle, May 6-13, 1995.
5. Steck AJ and Kappos L: *Changing concepts in inflammatory and paraneoplastic neuropathies*. Curr Neurol 16, 191-212 (1996).
6. Humbel RL and Schmit P: *Anticorps antigangliosides et neuropathies peripheriques*. Rev Med Liege 51, 368-375 (1996).
7. Quarles RH and Weiss MD: *Autoantibodies associated with peripheral neuropathy*. Muscle Nerve 22, 800-822 (1999).
8. Nobile-Orazio E: et al: *How useful are anti-neural IgM antibodies in the diagnosis of chronic immune-mediated neuropathies?* JNS 266, 156-163 (2008).

BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA



TIME TO RESULT: 4.5 HOURS

SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de 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>
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
MP	Microtiterplate Mikrotiterplatte Plaque de microtitration Microplaca Microplaca
BUF WASH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Waschpuffer-konzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage Tampón de lavado concentrado (x10) Tampón de lavado concentrado (x10)
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampón d'incubation Tampón de incubación Tampón de incubación

Symbol	Explanation
CONTROL -	Negative Control Negativkontrolle Contrôle négatif Control negativo Control negativo
CONTROL L	Low Control Kontrolle tief Contrôle faible Control bajo Control bajo
CONTROL M	Medium Control Kontrolle mittel Contrôle moyen Control medio Control medio
CAL	Calibrator Kalibrator Calibrateur Calibratore Calibrador
EL MIX	Enzyme Label Mix Enzymmarker-Mix Marqueur enzymatique Mix Marcato enzimatico Mix Mezcla de marcadores enzimáticos
SUBS TMB	TMB Substrate TMB Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato de TMB
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada



Printing Date
2010-10-07

BÜHLMANN GanglioCombi® ELISA is a registered trademark of BÜHLMANN Laboratories AG