



BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA

with enzyme labels IgG/IgM Mix, IgG and IgM

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

**For research use only.
Not for use in diagnostic procedures.**

EK-GCL-S-U 96 wells

Revision date: 2017-06-09

ENGLISH

INTENDED USE

BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA, is an *in vitro* test intended to detect antibodies against defined relevant neural antigens GM1, GD1b and GQ1b (IgG and IgM) in serum samples.

This product is for research use only. It is not intended for use in diagnostic procedures.

INTENDED APPLICATION

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

1. Testing with the IgG/IgM mix conjugate allows to screen for the presence of antibodies.
2. Testing with individual IgG and/or IgM conjugates for antibody isotype determination.
3. For laboratory work-up we suggest combining both procedures: sample screening using the mix (option 1), followed by differentiation of mix-positive samples by separate IgG and IgM enzyme labels (option 2).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

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

The measured absorbance is proportional to the titre of antibodies present in a given sample. The titres of antibodies are expressed as % ratios of the calibrator.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

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

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Enzyme Label IgG Anti-human IgG Ab conjugated to HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 mL	B-GCO-ELG	Ready to use
Enzyme Label IgM Anti-human IgM Ab conjugated to HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 mL	B-GCO-ELM	Ready to use
Enzyme Label Mix Anti-human IgG and IgM Ab conjugated to HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 mL	B-GCO-ELGM	Ready to use
TMB Substrate TMB in citrate buffer	1 vial 11 mL	B-TMB	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	1 vial 11 mL	B-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 1 month 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

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-STTS) 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.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- The procedure requires <0.1 mL of blood or <50 µL of serum, respectively.
- Refer to page 6 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 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 samples to be investigated 1:50 with incubation buffer. Use 30 µL of serum + 1470 µL (cold: 2-8 °C!) incubation buffer. Mix by vortexing and leave diluted samples as well as reconstituted calibrator and controls for 30 minutes at 2-8 °C prior to pipetting (refer to step 4a and 4b).
2. Prepare a plate-frame with the required number of strips to test the samples. Reseal the remaining strips in the foil pouch together with the desiccant packs immediately. Store refrigerated.
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: Use cold reagents in steps 3 to 9.

Option 1: Detection of IgG/IgM mix-isotypes

- 4a. Calibrator: Pipet 100 µL of calibrator into the well A1 (refer to figure 1A).
 - 4b. Controls: Pipet 100 µL of medium control into well B1, of low control into well A2 and of negative control into well B2 (refer to figure 1A).
- Note: If more than three strips per run are used, calibrator and controls can be tested in duplicates (see figure A).*
- 4c. Serum: Pipet 100 µL of diluted serum 1 into wells C1-E1 (refer to figure 1A).
 - 4d. Serum: Pipet 100 µL of diluted serum 2 into wells F1-H1 (refer to figure 1A).
 - 4e. Pipet 100 µL of diluted 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'. Serum: Pipet 100 µL of diluted serum 1 into wells C1-E1 (refer to figure 1B).

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

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

Detection of IgM isotypes.

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

For options 1 and 2: Sample incubation and washes

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

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

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

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

For option 2: Detection of IgG and IgM isotypes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 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 5 and 6 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. The calibrator must be within the established OD range. All controls must be within established confidence ranges (% ratio). The confidence ranges of the calibrator and for 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 3-10, been kept at 2-8 °C? ii) accuracy of pipets, thermometers, and timers, iii) settings of ELISA washer and reader, iv) expiration date of the reagents v) storage and incubation conditions vi) colour of the TMB substrate solution (should be colourless) and vii) purity of the water.

PERFORMANCE LIMITATIONS

- The BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA has not been validated for plasmapheresis samples.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-assay precision (within-run): 1.4-5.7 %CV (mean: 3.4 %). For each of the three gangliosides coated on the microtiter plate of the BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA test two anti-ganglioside positive sera were selected. The serum samples were assayed in twelve replicates in a single run for each of the enzyme labels: IgG/IgM Mix, IgG and IgM. The intra-assay precision was determined to be in the range of 2.6 to 4.5 % CV for the enzyme label Mix, 2.5 to 5.7 % CV for the enzyme label IgG and 1.4 to 5.2 % CV for the enzyme label IgM. The study was performed with one reagent lot. The results are summarized in table 7, 8 and 9.

Inter-assay precision (between-run): 8.0-21.0 %CV (mean: 12.1 %). For each of the three gangliosides coated on the microtiter plate of the BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA test two anti-ganglioside positive sera were selected. The serum samples were assayed in single replicates in 20 independent runs, with one run per day, for each of the enzyme labels: IgG/IgM Mix, IgG and IgM. The inter-assay precision was determined to be in the range of 8.2 to 15.2 % CV for the enzyme label Mix, 11.6 to 21.0 % CV for the enzyme label IgG and 8.0 to 15.6 % CV for the enzyme label IgM. The study was performed with one reagent lot. The results are summarized in table 10, 11 and 12.

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

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

Functional sensitivity: ≤ 8.1 %. A precision profile was generated from the results obtained in the inter-assay precision study described above, for two positive sera samples for each of the three gangliosides coated on the microtiter plate and detected with each of the enzyme labels: IgG/IgM Mix, IgG and IgM. The data points were fitted using a polynomial non-linear fit with a cubic function.

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

Linearity: The linear range of the BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA was determined according to the CLSI guideline EP06-A. Multiple sera with concentrations over the entire measuring range of the test, allowing the evaluation of the majority of ganglioside / enzyme label combinations, were used. Serum samples were diluted according to the instruction for use. In case of high positive serum samples a higher dilution of 1:2000 was applied. Subsequently dilution series from each sample were prepared in graduations of 10 % using incubation buffer as the diluent. Linearity was defined as the interval in which the relative difference between the linear and, if significant, higher order polynomial fit was below 20 %. For ratios ≤25 % an absolute difference of below 5 % ratio was allowed. A linear range covering and exceeding the BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA titre categories of <30 % - negative; 30-50 % - grey-zone; 50-100 % positive and >100 % strongly positive was confirmed. The results are summarized in table 13.

INTERFERING SUBSTANCES

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

FRANCAIS

DOMAINE D'UTILISATION

Le test de *in vitro* BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA est conçu pour la détection d'anticorps dirigés contre des antigènes neuronaux définis GD1b, GQ1b et GM1, dans le sérum.

Ce produit est destiné à la recherche uniquement et n'est pas prévu pour être utilisé à des fins de diagnostic.

APPLICATION PREVUE

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

1. Dépistage de la présence d'anticorps en utilisant le conjugué IgG/IgM Mix.
2. Détermination de l'isotype de chaque anticorps en utilisant le conjugué IgG ou IgM.
3. Pour la réalisation au laboratoire, il est possible de combiner les 2 applications : dépistage en utilisant le conjugué Mix (option 1), suivi par la différenciation des sérums « Mix-positifs » en utilisant les conjugués IgG et IgM séparément.

PRINCIPE DU DOSAGE

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

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

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

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

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

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

Tableau 1

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts / non entamés	
Stables à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.	
Réactifs ouverts / reconstitués	
Microplaque	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 1 mois à 2-8 °C. Ne pas congeler !
Contrôles	Stables durant 1 mois à 2-8 °C. Ne pas congeler !
Tampon d'incubation	Stables à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette
Marqueurs enzymatiques	
Substrat TMB	
Solution Stop	Stable à 18-28 °C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette

Tableau 2

PRECAUTIONS D'EMPLOI

Précautions de sécurité

- Le calibrateur (B-GCO-CA) et les contrôles de cette trousse (B-GCO-CONSET) contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées.
- **Solution Stop** : La Solution Stop (B-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 conservés au froid pendant le pipetage et les étapes de lavage. Le Substrat TMB doit être placé à température ambiante (18-28 °C).
- Étapes 3-9 : Utiliser des réactifs réfrigérés (2-8 °C) pour toutes ces étapes et les conserver réfrigérés durant le pipetage. Recommandation : Préparer le tampon de lavage le soir avant d'effectuer le dosage et le placer dans le réfrigérateur pendant la nuit.
- Étapes de lavage 3, 6 et 9 : les étapes de lavage sont cruciales et permettent d'ôter les résidus formés lors de la production (étape 3), et les anticorps non liés (étapes 6 et 9).
 - Toujours réaliser les étapes de lavage à froid (2-8 °C) avec du tampon de lavage
 - S'assurer que tous les puits sont complètement vides après le dernier cycle de lavage.
- Étape 9 : S'assurer d'utiliser du substrat TMB préalablement porté à température ambiante (18-28 °C).
- Étape 11 : Bien agiter la microplaque durant l'incubation avec le substrat. Selon l'agitateur utilisé, il est recommandé d'agiter entre 400 et 600 rpm. La solution doit s'agiter dans les puits mais sans déborder.

- Pour les laveurs automatiques, BÜHLMANN utilise le mode "plate mode", c'est à dire chaque étape du processus (distribution) est réalisée séquentiellement pour toutes les barrettes, avant de procéder à l'étape suivante du processus (aspiration).
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Il convient de prendre toutes les précautions requises pour empêcher toute contamination croisée entre réactifs, entre échantillons ou entre puits.
- Les puits sont à usage unique.

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.

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

- La procédure requiert <0.1 mL de sang ou <50 µL de sérum.
- Se référer à la page 11 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 avant de les stocker afin d'éviter les cycles répétés de congélation/décongélation. Conserver les échantillons de sérum à ≤ -20 °C durant 4 mois. Nous recommandons de congeler les échantillons à -70 °C pour la conservation à long terme (>1 année).
- Les échantillons congelés doivent être décongelés et homogénéisés par agitation ou par inversion avant leur utilisation.

PROCEDURE DE DOSAGE

Il est possible de choisir entre les 3 options suivantes :

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

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

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

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

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

Important : Continuer sans interruption avec l'étape suivante.

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

- 4a. Distribuer 100 µL de calibrateur dans 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 N° 1 dans les puits C1 à E1 (voir figure 1A).
- 4d. Distribuer 100 µL de sérum dilué N° 2 dans les puits F1 à H1 (voir figure 1A).
- 4e. Distribuer 100 µL de sérum dilué 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 N° 1 dans les puits C1 à E1 (voir figure 1B).

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

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

Détermination de l'isotype IgM

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

STANDARDISATION

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

RESULTATS ET CALCULS

Calcul des résultats

1. Mesurer l'absorbance (DO) à 450 nm de chaque puits (calibrateur, contrôles et échantillons).
2. Calculer la moyenne des duplicatas (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.

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 5 et 6. 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.

CONTROLE QUALITE

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

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

Le calibrateur doit se trouver dans l'intervalle de DO établi. Tous les contrôles doivent avoir une valeur comprise entre les limites de confiance établies (% Ratio). Les limites de confiance du calibrateur et des contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont indiquées sur le rapport de contrôle qualité contenu dans chaque coffret.

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 10 ? ii) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, iii) calibrage des instruments, iv) date de péremption des réactifs, v) conditions de stockage et d'incubation, vi) la solution de substrat TMB devrait être incolore, vii) pureté de l'eau.

LIMITES

- Le test BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA n'a pas été validé pour les échantillons de plasmaphérèse.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision intra-dosage (dans une même analyse) : 1,4-5,7 % CV (moyenne : 3,4 %). Pour chacun des trois gangliosides revêtus sur la plaque de microtitration du test BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA, deux sérums positifs anti-gangliosides ont été sélectionnés. Les échantillons de sérum ont été analysés en douze réplicats dans une seule analyse pour chacun des marqueurs enzymatiques : IgG/IgM Mix, IgG et IgM. La précision intra-dosage a été déterminée comme étant incluse dans l'intervalle allant de 2,6 à 4,5 % CV pour le marqueur enzymatique Mix IgG/IgM, de 2,5 à 5,7 % CV pour le marqueur enzymatique IgG et de 1,4 à 5,2 % CV pour le marqueur enzymatique IgM. L'étude a été mise en œuvre avec un seul lot de réactifs. Les résultats sont résumés dans les tableaux 7, 8 et 9.

Précision inter-dosage (entre analyses) : 8,0-21,0 % CV (moyenne : 12,1 %). Pour chacun des trois gangliosides revêtus sur la plaque de microtitration du test BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA, deux sérums positifs anti-gangliosides ont été sélectionnés. Les échantillons de sérum ont été analysés en un seul réplicat dans 20 analyses indépendantes, avec une analyse par jour, pour chacun des marqueurs enzymatiques : IgG/IgM Mix, IgG et IgM. La précision inter-dosage a été déterminée comme étant incluse dans l'intervalle allant de 8,2 à 15,2 % CV pour le marqueur enzymatique Mix IgG/IgM, de 11,6 à 21,0 % CV pour le marqueur enzymatique IgG et de 8,0 à 15,6 % CV pour le marqueur enzymatique IgM. L'étude a été mise en œuvre avec un seul lot de réactifs. Les résultats sont résumés dans les tableaux 10, 11 et 12.

Limite de blanc (LoB) : ≤ 6,1 %. La LoB a été établie selon la ligne directrice EP17-A du CLSI. Douze réplicats de blanc (tampon d'incubation) par ganglioside sont analysés en une seule analyse pour chacun des trois marqueurs enzymatiques : IgG/IgM Mix, IgG et IgM. La limite de blanc (LoB), exprimée sous forme du rapport en % sur l'absorbance du calibrateur, a été calculée comme étant de 6,1 % pour le marqueur enzymatique Mix IgG/IgM, ≤ 3.1 % pour le marqueur enzymatique IgG et ≤ 2.6 % pour le marqueur enzymatique IgM. La LoB la plus élevée obtenue avec les trois marqueurs enzymatiques différents a été utilisée pour déterminer la limite de blanc (LoB) globale. L'étude a été mise en œuvre avec un seul lot de réactifs. La LoB a été évaluée en utilisant l'analyse paramétrique.

Limite de détection (LoD) : $\leq 8,1$ %. La LoD a été établie selon la ligne directrice EP17-A du CLSI. Pour chacun des trois gangliosides revêtus sur la plaque de microtitration, un seul échantillon clinique représentant une faible concentration d'anticorps a été mesuré en douze réplicats, dans une analyse unique pour chacun des trois marqueurs enzymatiques : IgG/IgM Mix, IgG et IgM. La limite de détection (LoD), exprimée sous forme du rapport en % sur l'absorbance du calibrateur, a été calculée comme étant $\leq 8,1$ % pour marqueur enzymatique Mix IgG/IgM, $\leq 6,3$ % pour le marqueur enzymatique IgG, et $\leq 3,0$ % pour le marqueur enzymatique IgM. La LoD la plus élevée obtenue avec les trois marqueurs enzymatiques différents a été utilisée pour déterminer la limite de détection (LoD) globale. L'étude a été mise en œuvre avec un seul lot de réactifs. La LoD a été calculée en utilisant l'analyse paramétrique.

Sensibilité fonctionnelle : $\leq 8,1$ %. Un profil de précision a été généré à partir des résultats obtenus dans l'étude de précision entre dosages décrite ci-dessus, pour deux échantillons de sérum positifs pour chacun des trois gangliosides revêtus sur la plaque de microtitration et détectés avec chacun des marqueurs enzymatiques : IgG/IgM Mix, IgG et IgM. Les points de données ont été ajustés en utilisant un ajustement polynomial non linéaire avec une fonction cubique.

Les intervalles de confiance à 95 % de l'ajustement ont été déterminés et la sensibilité fonctionnelle a été déterminée sous forme de l'intersection de l'ajustement cubique avec le critère d'acceptation de 20 % CV. Les résultats sont résumés sur la figure 2.

Linéarité : L'intervalle linéaire du test BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA a été déterminé selon la ligne directrice EP06-A du CLSI. Plusieurs sérums dont les concentrations couvrent l'ensemble de l'intervalle de mesure du test ont été utilisés, ce qui permet l'évaluation de la majorité des combinaisons ganglioside/enzyme. Les échantillons de sérum 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 des titres du test BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA de < 30 % (négatif), 30-50 % (zone grise), 50-100 % (positif) et > 100 % (fortement positif) a été confirmé. Les résultats sont résumés dans le tableau 13.

SUBSTANCES INTERFÉRENTES

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

ESPAÑOL

USO PREVISTO

BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA es una prueba in vitro destinada a la detección de anticuerpos frente a los antígenos neurales definidos como relevantes GM1, GD1b y GQ1b (IgG e IgM) en muestras de suero.

Este producto es para uso únicamente en investigación. No está destinado a uso en procedimientos diagnósticos.

APLICACIÓN PREVISTA

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

1. Realización de la prueba con el conjugado mezcla de IgG/IgM, que permite detectar la presencia de anticuerpos.
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 sugerimos combinar ambos procedimientos: cribado de las muestras utilizando la mezcla (opción 1), seguido de la diferenciación de las muestras positivas para la mezcla mediante los marcadores enzimáticos de IgG e IgM separados (opción 2).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

La prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA se basa en la técnica de ensayo inmunométrico enzimático. Los pocillos de la placa de microtitulación suministrada están recubiertos con gangliósidos: GM1, GD1b y GQ1b.

El calibrador, los controles y los sueros se incuban en los pocillos de microtitulación, con lo que los anticuerpos frente a gangliósidos presentes en las muestras se unen a los gangliósidos inmovilizados. Tras un lavado para retirar las sustancias no unidas, esos anticuerpos se detectan con anticuerpos frente a IgG y/o IgM humanas marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un segundo paso de lavado en el que se retira el marcador enzimático no unido, se añade una solución sustrato que contiene tetrametilbencidina (TMB). Se desarrolla así una coloración azul proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos en los gangliósidos inmovilizados. El desarrollo de color se detiene añadiendo una solución de interrupción ácida (ácido sulfúrico diluido) que hace virar la solución azul hacia el amarillo. Se mide entonces la intensidad del color a 450 nm.

La absorbancia medida es proporcional al título de anticuerpos presente en una determinada muestra. Los títulos de anticuerpos se expresan como relaciones porcentuales con respecto al calibrador.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

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

Tabla 1

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

Reactivos sellados / sin abrir	
Todos los componentes del kit sellados/sin abrir permanecen estables a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.	
Reactivos abiertos / reconstituídos	
Placa de microtitulación	Devolver inmediatamente las tiras no utilizadas a la bolsa de aluminio que contiene los paquetes de desecante y volver a sellar la bolsa presionando el mecanismo de cierre del borde en toda su longitud. Conservar durante un periodo de hasta 4 meses entre 2 y 8 °C.
Tampón de lavado diluido	Conservar durante un periodo de hasta 4 meses entre 2 y 8 °C.
Calibrador	Conservar durante un periodo de hasta 1 mes entre 2 y 8 °C. ¡No congelar!
Controles	
Tampón de incubación	Conservar-entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
Marcadores enzimáticos	
Sustrato TMB	
Solución de interrupción	Conservar entre 18 y 28 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.

Tabla 2

PRECAUCIONES

Precauciones de seguridad

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

Precauciones técnicas

- Lea atentamente las instrucciones antes de llevar a cabo el análisis. El rendimiento de la prueba se verá adversamente afectado si los reactivos se diluyen de manera incorrecta, se modifican o se conservan en condiciones distintas de las indicadas en estas instrucciones de uso.
- La presencia de residuos en los pocillos de la placa de microtitulación es resultado del proceso de producción. Los residuos se retiran en el paso de lavado (paso nº 3 del procedimiento de ensayo) y no afectan a los resultados.
- Prepare los reactivos antes de iniciar el procedimiento de ensayo. Los reactivos empleados en los pasos nº 3 a 9 deben estar fríos (entre 2 y 8 °C) y mantenerse fríos durante el pipeteo y el lavado. Ponga el sustrato TMB a temperatura ambiente (entre 18 y 28 °C).
- Pasos nº 3 a 9: Utilice reactivos fríos (entre 2 y 8 °C) en todos estos pasos y manténgalos fríos durante el pipeteo. Recomendación: Preparar el tampón de lavado por la noche antes de realizar el ensayo y manténgalo en el refrigerador durante la noche.
- Pasos de lavado nº 3, 6 y 9: Los pasos de lavado son cruciales para retirar los residuos presentes en los pocillos de la placa de microtitulación como resultado del proceso de producción (paso nº 3) así como cualquier anticuerpo no unido (pasos nº 6 y 9).
 - Realice siempre los pasos de lavado con tampón de lavado frío (entre 2 y 8 °C).
 - Asegúrese de que los pocillos estén completamente vacíos tras el último ciclo de lavado.
- Paso nº 9: Ajuste el sustrato TMB a temperatura ambiente (entre 18 y 28 °C) antes de utilizarlo.

- Paso nº 11: Agite las placas de microtitulación durante la incubación con sustrato. Dependiendo del agitador de placas orbital, recomendamos una velocidad de entre 400 y 600 rpm. La solución debería moverse en los pocillos pero sin derramarse fuera.
- Si se utiliza un lavador automatizado, se deberá elegir el "modo placa" para que el dispensado se realice de manera secuencial en todas las tiras antes de proceder a la aspiración.
- Los componentes no se deben utilizar más allá de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No se deben mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Se deben realizar los máximos esfuerzos para asegurar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos y muestras o entre pocillos.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.

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.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

- El procedimiento requiere <0,1 mL de sangre y <50 µL de suero respectivamente.
- Consulte en la página 16 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 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 → muestras positivas para anticuerpos autoinmunes → Opción 2.

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

1. Diluya todas las muestras 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 reconstituídos 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. 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: Pipetee 100 µL de suero nº 1 diluido en los pocillos C1 a E1 (consulte la figura 1A).
- 4d. Suero: Pipetee 100 µL de suero nº 2 diluido en los pocillos F1 a H1 (consulte la figura 1A).
- 4e. Pipetee 100 µL de los sueros 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: Pipetee 100 µL de suero nº 1 diluido en los pocillos C1 a E1 (consulte la figura 1B).
- 4d'. Suero: Pipetee 100 µL de suero nº 2 diluido en los pocillos C1 a H1 (consulte la figura 1B).

4e'. Pipetee 100 µL de los sueros 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.

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:

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

Isotipos mezcla de IgG/IgM

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

Isotipos de IgG e IgM

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

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 5 y 6 son ejemplos. Es preciso utilizar el calibrador y los controles en cada ensayo individual.

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.

El calibrador debe estar dentro del intervalo de DO establecido. Todos los controles deben estar dentro de los intervalos de confianza establecidos (relación porcentual). Los intervalos de confianza del calibrador y de los controles son específicos del lote y aparecen impresos en la ficha de datos de CC que se suministra con este kit.

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

LIMITACIONES DE RENDIMIENTO

- La prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA no ha sido validada para muestras de plasmáféresis.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Precisión intraensayo (dentro de una misma ejecución): 1,4-5,7 % CV (media: 3,4 %). Para cada uno de los tres gangliósidos de recubrimiento de la placa de microtitulación de la prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA, se seleccionaron dos sueros positivos para anticuerpos frente al gangliósido. Las muestras de suero se ensayaron en doce réplicas en una única ejecución para cada uno de los marcadores enzimáticos: mezcla IgG/IgM, IgG e IgM. La precisión intraensayo se determinó como dentro del rango de entre 2,6 y 4,5 % CV para la mezcla de marcadores enzimáticos, entre 2,5 y 5,7 % CV para el marcador enzimático de IgG y entre 1,4 y 5,2 % CV para el marcador enzimático de IgM. El estudio se realizó con un lote de reactivo. Los resultados se resumen en las tablas 7, 8 y 9.

Precisión interensayo (entre ejecuciones): 8,0-21,0 % CV (media: 12,1 %). Para cada uno de los tres gangliósidos de recubrimiento de la placa de microtitulación de la prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA, se seleccionaron dos sueros positivos para anticuerpos frente al gangliósido. Las muestras de suero se ensayaron en réplicas individuales en 20 ejecuciones independientes, una ejecución al día, para cada uno de los marcadores enzimáticos: mezcla IgG/IgM, IgG e IgM. La precisión interensayo se determinó como dentro del rango de entre 8,2 y 15,2 % CV para la mezcla de marcadores enzimáticos, entre 11,6 y 21,0 % CV para el marcador enzimático de IgG y entre 8,0 y 15,6 % CV para el marcador enzimático de IgM. El estudio se realizó con un lote de reactivo. Los resultados se resumen en las tablas 10, 11 y 12.

Límite del blanco (LoB): ≤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. El límite del blanco (LoB) expresado como la relación porcentual con respecto a la absorbancia del calibrador se calculó como del 6,1 % para la mezcla de marcadores enzimáticos de IgG/IgM, ≤3,1 % para el marcador enzimático de IgG y ≤2,6 % para el marcador enzimático de IgM. El valor de LoB más alto obtenido con los tres marcadores enzimáticos diferentes se utilizó para determinar el límite del blanco (LoB) global. El estudio se realizó con un lote de reactivo. El LoB se evaluó mediante análisis paramétrico.

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

Sensibilidad funcional: $\leq 8,1$ %. Se generó un perfil de precisión a partir de los resultados obtenidos en el estudio de la precisión interensayo anteriormente descrito, para dos muestras de suero positivas para cada uno de los tres gangliósidos de recubrimiento de la placa de microtitulación y detectados con cada uno de los marcadores enzimáticos: mezcla IgG/IgM, IgG e IgM. Los puntos de datos se ajustaron utilizando un ajuste no lineal polinómico con una función cúbica. Se determinaron los intervalos de confianza del 95 % del ajuste y se determinó la sensibilidad funcional como la intersección del ajuste cúbico con el criterio de aceptación del 20 % CV. Los resultados se resumen en la figura 2.

Linealidad: El rango lineal de la prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA se determinó de conformidad con la directriz CLSI EP06-A. Se utilizaron varios sueros con concentraciones que abarcan todo el rango de medición de la prueba, haciendo posible la evaluación de la mayoría de las combinaciones gangliósido/marcador enzimático. Las muestras de suero se diluyeron según las instrucciones de uso. Para las muestras de suero fuertemente positivo se aplicó una dilución mayor, de 1:2000. Seguidamente se prepararon series de dilución de cada muestra en graduaciones del 10 % utilizando tampón de incubación como diluyente. La linealidad se definió como el intervalo en el cual la diferencia relativa entre el ajuste lineal y, cuando sea significativo, el ajuste polinómico de orden superior es inferior al 20 %. Para relaciones ≤ 25 % se permitió una diferencia absoluta inferior al 5 %. Se confirmó la existencia de un rango lineal que cubre y excede las categorías de título de la prueba BÜHLMANN GanglioCombi™ *Light* ELISA de <30 % - negativo; 30-50 % - zona gris; 50-100 % - positivo y >100 % - fuertemente positivo. Los resultados se resumen en la tabla 13.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

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

APPENDIX I

TABLES / TABLES / TABLAS

Microtiter plate set-up

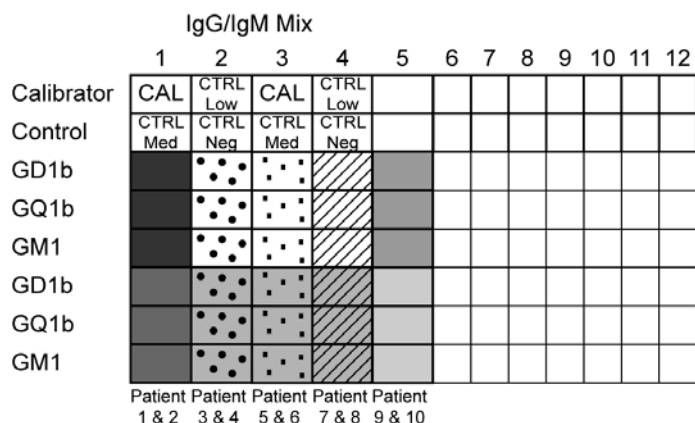


Figure 1A: IgG-Mix conjugate: 24 samples / kit (1 MP / kit)

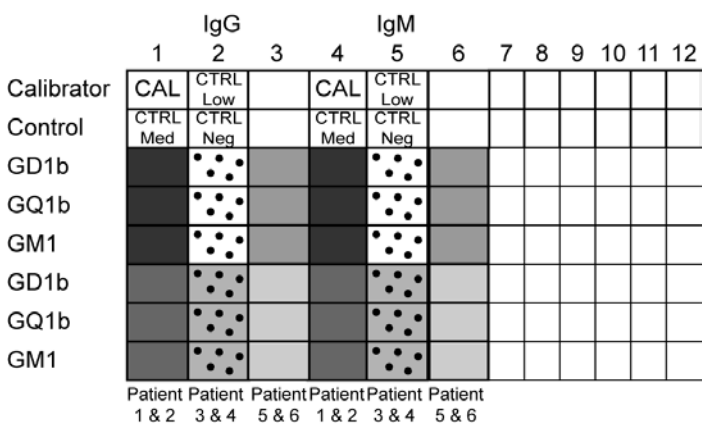


Figure 1B: IgG & IgM conjugate: 2 profiles / sample, 12 samples / kit (1 MP / kit)

Example of results

A IgG/IgM mix conjugate

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

Table 5

B IgG & IgM conjugate

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

Table 6

Intra-assay precision (within-run)

Enzyme label IgG/ IgM						
Gangliosides	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b	GM1	GM1
Sample	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	110	310	286	84	86	156
SD [Ratio]	4.0	8.0	9.2	3.8	2.4	5.0
CV [%]	3.6	2.6	3.2	4.5	2.8	3.2
Range all sera [%]	2.6-4.5					
Mean all sera [%]	3.3					

Table 7

Enzyme label IgG						
Gangliosides	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b	GM1	GM1
Sample	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	139	111	89	222	59	82
SD [Ratio]	4.0	2.8	4.5	5.8	1.6	4.7
CV [%]	2.9	2.5	5.1	2.6	2.7	5.7
Range all sera [%]	2.5-5.7					
Mean all sera [%]	3.6					

Table 8

Enzyme label IgM						
Gangliosides	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b	GM1	GM1
Sample	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	56	142	72	74	79	87
SD [Ratio]	2.5	3.3	3.8	2.6	1.8	1.2
CV [%]	4.4	2.3	5.2	3.5	2.3	1.4
Range all sera [%]	1.4-5.2					
Mean all sera [%]	3.2					

Table 9

APPENDIX I

TABLES / TABLES / TABLAS

Inter-assay precision (between-run)

Enzyme label IgG/ IgM						
Gangliosides	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b	GM1	GM1
Sample	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	96	306	92	262	74	184
SD [Ratio]	9.6	26.8	7.6	26.6	7.0	27.8
CV [%]	10.1	8.8	8.2	10.1	9.5	15.2
Range all sera [%]	8.5-15.2					
Mean all sera [%]	10.3					

Table 10

Enzyme label IgG						
Gangliosides	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b	GM1	GM1
Sample	1	2	1	2	1	2
Mean [Ratio]	109	140	42	204	52	84
SD [Ratio]	14.2	18.5	8.3	23.6	6.4	17.6
CV [%]	13.0	13.2	19.6	11.6	12.4	21.0
Range all sera [%]	11.6-21.0					
Mean all sera [%]	15.2					

Table 11

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

Table 12

Linearity

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

Table 13

Functional sensitivity

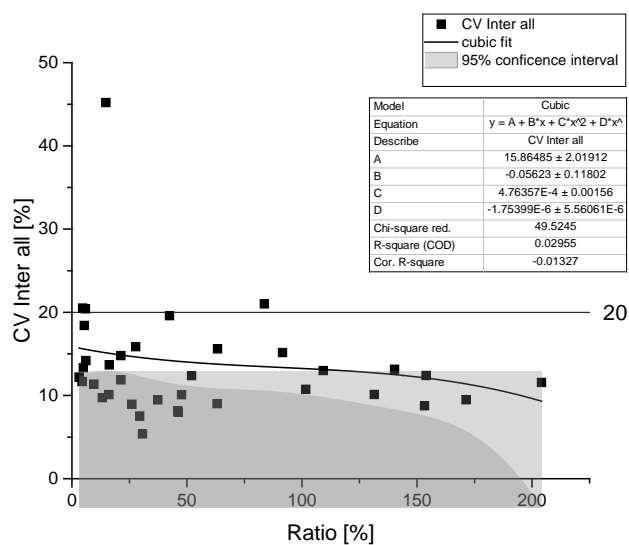
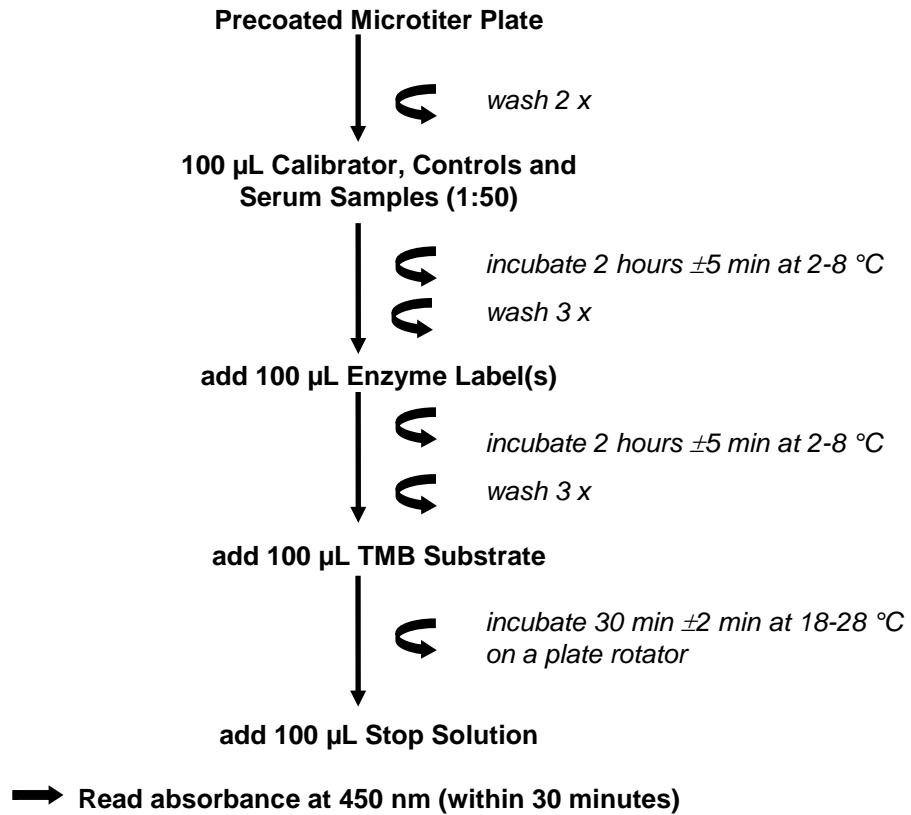


Figure 1



BÜHLMANN GanglioCombi™ Light ELISA



TIME TO RESULT: 4.5 HOURS

APPENDIX III

SYMBOLS / SYMBOLES / SIMBOLOS

Symbol	Explanation	Symbol	Explanation
	Use By Utiliser jusqu'au Fecha de caducidad	CONTROL L	Low Control Contrôle faible Control bajo
REF	Catalogue number Référence du catalogue Número de catálogo	CONTROL M	Medium Control Contrôle moyen Control medio
LOT	Batch code Code du lot Codigo de lote	CAL	Calibrator Calibrateur Calibrador
	Temperature limitation Limites de température Limite de temperature	EL IgG	Enzyme Label IgG Marqueur enzymatique IgG Marcador enzimático IgG
MP	Microtiterplate Plaque de microtitration Placa de microtitulación	EL IgM	Enzyme Label IgM Marqueur enzymatique IgM Marcador enzimático IgM
BUF WASH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Concentré de tampon de lavage Tampón de lavado concentrado (x10)	EL MIX	Enzyme Label IgG/IgM Mix Marqueur enzymatique IgG/IgM mix Mezcla de Marcador enzimático
BUF INC	Incubation Buffer Tampon d'incubation Tampón de incubación	SUBS TMB	TMB Substrate Substrat TMB Substrato TMB
CONTROL -	Negative Control Contrôle négatif Control negativo	SOLN STOP	Stop Solution Solution stop Solución de interrupción