



anti-GM1 Autoantibodies ELISA

with Enzyme Labels IgG and IgM

EK-GM1-GM 96 wells

Revision date: 2016-09-12

ENGLISH

INTENDED USE

The assay anti-GM1 Autoantibodies ELISA is designed for the quantitative determination of IgG and/or IgM of auto-antibody isotype directed against GM1 in human serum (ref. 1-7) using individual IgG- and IgM-conjugates.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The anti-GM1 Autoantibodies ELISA is based on the enzyme-immunometric assay technique. The wells of the provided microtiter plate are coated with gangliosides: GM1.

Calibrator, Controls, and patient sera are incubated in the microtiter wells and anti-GM1 auto-antibodies present in the samples bind to the immobilized GM1. 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 anti-GM1 auto-antibodies bound to the gangliosides, GM1. 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 anti-GM1 auto-antibodies present in a given sample. The titres of anti-GM1 auto-antibodies are expressed as % Ratios of the calibrator and can be assigned to titre categories (negative, grey zone, positive, strongly positive).

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Microtiter Plate precoated with GM1	12 x 8 wells	B-GM1-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 IgG Anti-human IgG Ab conjugated to HRP in a protein-base 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-base buffer with preservatives	1 vial 11 mL	B-GCO-ELM	Ready to use

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
TMB Substrate TMB in citrate buffer	1 vial 11 mL	B-TMB	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	1 vial 11 mL	B-ST5	Ready to use Corrosive agent

Table 1

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Sealed / Unopened Reagents	
All sealed/unopened kit components are stable at 2-8 °C until the expiration date printed on the labels.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Microtiter Plate	Return unused strips immediately to the aluminum 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
Controls	2-8 °C. Do not freeze!
Incubation Buffer	Store at 2-8° C until expiration date printed on the labels.
Enzyme Label	
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-ST5) 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 auto-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 and <50 µL of serum, respectively.
- Lipemic, hemolytic and icteric samples should not be used in this assay. Lipemic samples can be avoided by asking patients to fast for at least 12 hours prior to the sample being taken.
- Collect blood into plain tubes (no anti-coagulant), avoid haemolysis, leave to clot for one hour, centrifuge for 10 minutes at approximately 1500 x g at room temperature (18-28 °C), collect the serum.
- We recommend freezing aliquots of patient samples if you need to store samples in order to avoid repeated freezing/thawing.

- Store serum samples at ≤ -20 °C up to 4 months. For long-term storage we recommend -70 °C (samples are stable for >1 year). Frozen samples should be thawed and vortexed thoroughly prior to use.

ASSAY PROCEDURE

1. Dilute all patient samples to be investigated 1:50 with cold 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.
2. Prepare a plate-frame with the required number of strips to test the patient samples. Reseal the remaining strips in the foil pouch together with the desiccant packs immediately. Store refrigerated.

Note: Use cold reagents in steps 3 to 9.

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

Note: Immediately proceed to the next steps.

Detection of IgG-Isotype:

Note: We recommend testing Calibrator, Controls and samples in duplicates

- 4a. Calibrator: Pipet 100 µL of the Calibrator into the well A1 and A2 (refer to Figure 1).
- 4b. Controls: Pipet 100 µL of the Control Medium into well B1, and B2, Control Low into well C1 and C2 and Control Negative into the well D1 and D2 (refer to Figure 1).
- 4c. Patient serum: Pipet 100 µL of diluted patient serum 1 into the wells E1-E2 (refer to Figure 1).
- 4d. Patient serum: Pipet 100 µL of diluted patient serum 2 into the wells F1-F2 (refer to Figure 1).
- 4e. Pipet 100 µL of diluted patient sera x-y into the subsequent wells (refer to Figure 1).

Detection of IgM-Isotype

- 4f. Repeat step 4a-4e using the subsequent wells.

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.

Detection of IgG and IgM Isotypes

7. Add 100 µL of Enzyme Label IgG or IgM to the respective wells.

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 patient samples).
2. Average the duplicate Calibrator and Control values (if available).
3. Results are expressed as ratio of absorbance of samples and the (averaged) absorbance of the Calibrator.

$$\% \text{ Ratio} = \frac{\text{absorbance of samples and Controls}}{\text{absorbance of Calibrator}} \times 100$$

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

Note: Results presented in table 16 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-GM1 auto-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 Controls are lot-specific. Please refer to the QC data sheet delivered with this kit for confidence ranges.

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) vii) purity of the water.

PERFORMANCE LIMITATIONS

- The anti-GM1 Autoantibodies ELISA has not been validated for plasmapheresis samples.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision (Within-Run): 7.0 %. The intra-assay precision was calculated from results of 12 values of three IgM and IgG samples in a single run. The values are listed in table 17 as % Ratio as described in "results and calculation".

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 11.1 %. The inter-assay precision has been determined by measuring three serum samples with IgG and three with IgM antibodies to GM1 in 20 different runs. The values are listed in table 18 as % Ratio as describe in "results and calculation".

Detection Limit (LOB): 12 Incubation Buffer replicates were assayed in a single run. The detection limit expressed as the % Ratio of the calibrator was calculated to be ≤5 %.

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 20 and 100 % Ratio. Results above 100 % 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 antibodies were incubated over night with the corresponding soluble antigen in different concentrations and subsequently tested in the anti-GM1 Autoantibodies ELISA according to the assay procedure. Specificity of the antibody 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: 60 mg/dL; unconjugated bilirubin: 40 mg/dL and hemoglobin: 400 mg/dL.

REFERENCE INTERVALS AND CUT-OFF RATIOS

In co-operation with the institutions mentioned below, a cut-off of 50 % has been established. Values <30 % have been clearly classified as negative. The established 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 anti-GM1 auto-antibodies according to the assay procedure. Results of normal blood donors are shown in table 19.

Guidelines for the use of cut-off and Titer Categories/Ratios (%):

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

Table 3

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.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der Test anti-GM1 Autoantibodies ELISA dient zur direkten quantitativen, Bestimmung von IgG- und IgM-Antikörpern gegen das Gangliosid GM1 in humanem Serum (Ref. 1-7).

PRINZIP DER METHODE

Der vorliegende anti-GM1 Autoantibodies ELISA ist ein enzym-immunometrischer Festphasentest. Die Mikrotiterplatte ist streifenweise mit GM1 beschichtet. Kalibrator, Kontrollen und Serumproben werden in den Mikroküvetten der Mikrotiterplatte inkubiert und die potenziell vorhandenen anti-GM1 Autoantikörper binden an das immobilisierte GM1. Durch Waschschriffe werden ungebundene Substanzen entfernt. Die mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierten Antikörper werden gegen menschliches IgG und/oder IgM nachgewiesen. Nach einem zweiten Waschschriff, bei dem der ungebundene Enzymmarker entfernt wird, wird eine Substratlösung, die Tetramethylbenzidin (TMB) enthält, zugegeben. Durch die Enzymreaktion entsteht eine Blaufärbung. Die Blaufärbung verhält sich proportional zur Menge an Antikörpern, die an die immobilisierten Ganglioside gebunden sind. Die Zugabe einer sauren Stopplösung (verdünnte Schwefelsäure) beendet die Reaktion und bewirkt einen gelben Farbumschlag. Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung, ist proportional zum Titer der anti-GM1 Autoantikörper in den Proben. Die Titer der anti-GM1 Autoantikörper werden als %-Verhältnis (% Ratio) zum Kalibrator angegeben und kann zu den Titerkategorien zugeteilt werden (negativ, Grauzone, positiv, stark positiv).

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Mikrotiterplatte Beschichtet mit GM1	8 x 12 Küvetten	B-GM1-MP	Gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Stück		
Waschpuffer Konzentrat (10x) Mit Konservierungsmitteln	1 Flasche 100 mL	B-GCO-WB	Mit 900 mL deionisiertem Wasser verdünne
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-IgG Anti-human-IgG, gekoppelt mit HRP in einem Protein-basierten Puffer mit Konservierungsmitteln	1 Flasche 11 mL	B-GCO-ELG	Gebrauchsfertig

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Enzymmarker-IgM Anti-human-IgM, gekoppelt mit HRP in einem Protein-basierten Puffer mit Konservierungsmitteln	1 Flasche 11 mL	B-GCO-ELM	Gebrauchsfertig
TMB-Substrat in Zitrat-gepufferter Lösung	1 Flasche 11 mL	B-TMB	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M Schwefelsäure	1 Flasche 11 mL	B-ST5	Gebrauchsfertig Korrosiv

Tabelle 4

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Zu verwenden bis zum Verfallsdatum angegeben auf der Packungsetikette. Lagerung bei 2-8 °C.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Microtiterplatte	Ungebrauchte Streifen sofort in die mit Trockenmittel versetzte Aluminiumpackung zurücklegen. 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.
Enzymmarker	Bei 2-8 °C lagern.
TMB Substrat	
Stopp-Lösung	Zu verwenden bis zum Verfallsdatum. Bei 18-28 °C lagern.

Tabelle 5

VORSICHTSMASSAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

- Kalibrator (B-GCO-CA) und Kontrollen (B-GCO-CONSET) enthalten Bestandteile humanen Ursprungs. Obwohl sie in Tests für HBV Oberflächenantigen-, HCV- und HIV1/2-Antikörper negativ waren, sollten sie gemäss „Guter Laborpraxis“ als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- **Stopp-Lösung:** Die Stopp-Lösung (B-ST5) enthält Schwefelsäure (0.25 M). Das Reagenz reizt die Augen, Haut und Schleimhäute. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.
- **Reagenzien:** Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Im Falle eines Kontaktes sofort mit reichlich Wasser spühlen, ansonsten kann eine Reizung oder Verätzungen auftreten.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss den gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

- Lesen Sie die Arbeitsanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig durch. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden und wenn die Komponenten nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Auf Grund des Produktionsprozesses kann es Rückstände in den Mikroküvetten der Mikrotiterplatten haben.

Sie werden mit dem 1. Waschschritt (Schritt 3) entfernt und haben keinen Einfluß auf die Ergebnisse.

- Die Reagenzien sind vor dem Start des Testverfahrens vorzubereiten. Die in den Schritten 3-9 verwendeten Reagenzien müssen gekühlt verwendet werden (2-8 °C) und während des Pipettierens und Waschens kalt gehalten werden. Bringen Sie das TMB Substrat beim Teststart auf Raumtemperatur (18-28 °C).
- Schritt 3-9: In allen Schritten sollten auf 2-8 °C gekühlte Reagenzien verwendet werden und während des Pipettierens kalt gehalten werden. Empfehlung: Bereiten Sie den Waschpuffer am Abend vor der Testdurchführung vor und stellen Sie ihn über Nacht in den Kühlschrank.
- Waschschritte (Schritte 3, 6 und 9): Die Waschschritte sind entscheidend für die Entfernung von potenziellen Rückständen in den Küvetten der Mikrotiterplatten. Sie stammen aus allfälligen Rückständen aus dem Produktionsprozess; (Schritt 3) bzw. nicht gebundene Autoantikörper (Schritte 6 und 9).
 - Alle Waschschritte sind mit kaltem Waschpuffer (2-8 °C) durchzuführen.
 - Alle Mikroküvetten müssen jeweils nach dem letzten Waschzyklus vollständig entleert sein.
- Schritt 9: Das verwendete TMB Substrat muss vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-28 °C) gebracht werden.
- Schritt 11: Während der Substratinkubation muss die Platte jeweils geschüttelt werden. Empfohlene Umdrehungen pro Minute: 400 bis 600. Die angegebenen Umdrehungen pro Minute (400-600) können nicht direkt auf jeden Schüttler übertragen werden. Die Lösung in den Mikroküvetten soll in Bewegung gebracht werden, darf aber nicht überschwappen.
- Wird ein Waschautomat eingesetzt, soll der sogenannte „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass das Einfüllen des Waschpuffers erst über die gesamte Platte ausgeführt, bevor das Absaugen gestartet wird.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kit Lots.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu einer Kontamination zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und Mikroküvetten kommt.
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

- Der Ansatz benötigt <0.1 mL Blut oder <50 µL Serum.
- Lipämische Proben können verhindert werden, indem der Patient mindestens 12 Stunden vor der Blutentnahme keine Nahrung zu sich nimmt.
- Blutproben in den entsprechenden Röhrchen sammeln (ohne Antikoagulanzen). Hämolyse vermeiden. Eine Stunde lang bei RT (18-28 °C) gerinnen lassen. 10 Minuten lang bei RT und ca. 1500 x g zentrifugieren und danach Serum abnehmen.
- Für die Probenlagerung empfehlen wir die Herstellung von Aliquots um wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden.
- Lagerung von Serumproben bis zu 4 Monaten bei ≤ -20 °C. Für längerfristige Lagerung empfehlen wir die Lagerung bei -70 °C (Probenstabilität >1 Jahr). Proben sollten vor dem Gebrauch aufgetaut und mit dem Vortexer gut gemischt werden.

ARBEITSANLEITUNG

1. Patientenproben mit kaltem 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 vorbereiten. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und sofort mit dem Trockenmittel verpacken und gekühlt lagern.

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

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

Hinweis: Fahren Sie den Ansatz sofort mit dem nächsten Schritt fort.

Bestimmung des IgG Isotyps:

Wir empfehlen Kalibrator, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung anzusetzen.

- 4a. 100 µL Kalibrator in die Mikroküvette A1 und A2 pipettieren.
- 4b. 100 µL Kontrolle Mittel in die Mikroküvette B1 und B2, 100 µL Kontrolle Niedrig in die Mikroküvette C1 und C2 und 100 µL Kontrolle Negativ in D1 und D2 pipettieren (siehe Abbildung 1).
- 4c. 100 µL Serumprobe 1 in die Mikroküvetten E1-E2 pipettieren (siehe Abbildung 1).
- 4d. 100 µL Serumprobe 2 in die Mikroküvetten F1-F2 pipettieren (siehe Abbildung 1).
- 4e. 100 µL Serumproben x-y in die nächsten Mikroküvetten pipettieren, wie es in Abbildung 1 dargestellt ist.

Bestimmung des IgM Isotyps:

4f. Die Schritte 4a-4e unter Verwendung der nachfolgenden Mikroküvetten wiederholen.

Inkubation der Proben und Waschen

5. Mikrotiterplatte mit einer Abdeckfolie abdecken und während 2 Stunden \pm 5 Minuten bei 2-8 °C inkubieren (Mikrotiterplatte nicht schütteln).
6. Abdeckfolie entfernen, die Mikroküvetten entleeren und mindestens dreimal mit jeweils \geq 300 μ L kalten Waschpuffer waschen. Platte auf saugfähigem Papier ausschlagen, um Waschpuffer vollständig zu entfernen.

Bestimmung mit IgG und IgM Einzel-Konjugate

7. 100 μ L Enzymkonjugatlösung zu jeder Mikroküvette zugeben.

Inkubation mit Enzym Konjugaten, Waschen und Detektion

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

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

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

STANDARDISIERUNG

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

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Auswertung:

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

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

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

Hinweis: Tabelle 16 zeigt typische Messwerte für den anti-GM1 Autoantibodies 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 durch die Einhaltung der Arbeitsanleitung erreicht.

Da es keine kommerziell erhältlichen Kontrollen für Anti-GM1-Autoantikörper gibt, wird empfohlen, positive und negative Serumproben als interne Qualitätskontrolle anzuwenden.

Der Kalibrator muss innerhalb des etablierten OD-Bereichs liegen. Alle Kontrollen müssen im etablierten Konfidenzbereich (% Ratio) liegen. Die Konfidenzbereiche des Kalibrators und der Kontrollen sind Lot-spezifisch und auf dem zusätzlichen Qualitätskontrolldatenblatt angegeben.

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

EINSCHRÄNKUNGEN DER LEISTUNGSMERKMALE

- Der anti-GM1 Autoantibodies ELISA wurde für Plasmapherese-Proben nicht validiert.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay-Präzision (Within-Run): 7.0 %. Die Intra-Assay-Präzision wurde aus 12 Werten von zwei IgM und/oder IgG positiven Proben im gleichen Ansatz bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 als % Ratio angegeben.

Inter-Assay-Präzision (Run-to-Run): 11.1 %. Die Inter-Assay-Präzision wurde durch die Messung von verschiedenen Serumproben mit allen drei Gangliosiden in 20 verschiedenen Ansätzen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 als % Ratio angegeben.

Nachweisgrenze (LoB): Zwölf Tests mit Inkubationspuffer wurden im gleichen Ansatz für sämtliche Ganglioside durchgeführt. Die Nachweisgrenze, ausgedrückt als % Ratio zum Kalibrator, wurde berechnet, und liegt \leq 5 %.

Verdünnungslinearität: Die Linearität des Testsystems wurde ermittelt gemäss den CLSI Richtlinien EP06-A. Das System ist linear in dem diagnostisch relevanten Bereich zwischen 20 and 100 % Ratio. Ergebnisse oberhalb von 100 % Ratio werden klinisch korrekt klassifiziert und können durch zusätzliche Verdünnungen (1:5/1:10) in den linearen Bereich hinein verdünnt werden.

Spezifität: Verschiedene Patientenserumproben mit spezifischen anti-Gangliosid- IgM und/oder IgG- Antikörper wurden über Nacht mit dem entsprechenden gelösten Antigen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und danach im anti-GM1 Autoantibodies ELISA getestet. Die Spezifität der Antikörperbindung für ein spezifisches Antigen wurde gezeigt durch die Inhibierung mit dem entsprechenden Antigen zwischen 1 und 100 μ g/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.

REFERENZINTERVALLE 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 anti-GM1 Antikörper entsprechend der Arbeitsvorschrift analysiert. Die Resultate der Blutspender sind in Tabelle 19 dargestellt.

Richtwerte für die Beurteilung der Ergebnisse:

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

Tabelle 6

¹) Erhalten vom Blutspendezentrum der Universität Basel

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

FRANCAIS

DOMAINE D'UTILISATION

Le test anti-GM1 Autoantibodies ELISA a été conçu pour la détermination quantitative des taux sériques d'auto-anticorps IgG et IgM dirigés contre le ganglioside GM1 (réf. 1-7).

PRINCIPE DU DOSAGE

Le test anti-GM1 Autoantibodies ELISA est basé sur une méthode immunométrique de type "sandwich".

Les puits des plaques incluses dans le coffret sont coâtés avec l'antigène ganglioside GM1.

Les échantillons sériques à tester ainsi que le calibrateur et les contrôles sont incubés dans la microplaque pendant deux heures. Les auto-anticorps anti-GM1 présents sont liés aux GM1 coâtés sur la plaque.

Après l'élimination par lavage des composants non liés, des anticorps (Ac) dirigés contre les IgG ou IgM humaines et conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) sont ajoutés aux puits et la microplaque est incubée une nouvelle fois pendant deux heures. Après un second lavage, ayant pour but d'éliminer les anticorps marqués non liés, le substrat TMB (tétraméthylbenzidine) est ajouté, induisant une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'auto-anticorps anti-GM1 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'auto-anticorps anti-GM1 présents dans les échantillons. Les titres sont exprimés en % Ratio par rapport au calibrateur. Les catégories de résultats sont les suivantes : négatif, zone grise, positif, fortement positif. Les taux d'auto-anticorps anti-GM1 sont exprimés quantitativement à l'aide d'un % Ratio du calibrateur.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque Coâtée (GM1)	12 x 8 puits	B-GM1-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

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
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
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-STTS	Prête à l'emploi Corrosif

Tableau 7

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts / non entamés	
Stables à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.	
Réactifs ouverts / reconstitués	
Microplaque	Replacer immédiatement les barrettes non utilisées dans le sachet en aluminium contenant le dessiccateur puis le refermer soigneusement. Stable 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

Tableau 8

PRECAUTIONS

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 pour la manipulation et l'élimination des réactifs du kit, nous vous recommandons fortement de consulter l'organisme réglementaire compétent pour votre pays.

Précautions techniques

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Le test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte, de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- Les puits de la microplaque sont recouverts de cristaux de sel formés lors du processus de production. Ils sont éliminés par le lavage (voir l'étape 3 de la procédure) et n'ont aucune influence sur les résultats.
- Préparer les réactifs avant de démarrer la procédure de test. Les réactifs utilisés dans les étapes 3 à 9 doivent être froids (2-8 °C) et conserver au froid pendant le pipetage et les étapes de lavage. Le Substrat TMB doit être placé à température ambiante (18-28 °C).
- Étapes 3-9: Utiliser des réactifs réfrigérés (2-8 °C) pour toutes ces étapes et les conserver réfrigérés durant le pipetage. Recommandation : Préparer le tampon de lavage le soir avant d'effectuer le dosage et le placer dans le réfrigérateur pendant la nuit.
- Étapes de lavage 3, 6 et 9 : les étapes de lavage sont cruciales et permettent d'ôter les résidus formés lors de la production (étape 3), et les auto-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.
- Les échantillons lipémiques peuvent être évités en demandant aux patients de jeûner durant au moins 12 heures avant le prélèvement.
- Prélever le sang dans des tubes prévus à cet usage en évitant l'hémolyse, laisser coaguler à température ambiante (18-28 °C) pendant 1 heure, centrifuger à environ 1500 x g à température ambiante et recueillir le sérum.
- Nous recommandons d'aliquoter les échantillons des patients avant de les stocker afin d'éviter les cycles répétés de congélation/décongélation. Conserver les échantillons de sérum à ≤ -20 °C durant 4 mois. Nous recommandons de congeler les échantillons à -70 °C pour la conservation à long terme (>1 année).
- Les échantillons congelés doivent être décongelés et homogénéisés par agitation ou par inversion avant leur utilisation.

PROCEDURE

1. Effectuer une dilution au 1:50 des échantillons de patient avec le tampon d'incubation (ex. 30 µL de sérum + 1470 µL de tampon d'incubation), à froid 2-8 °C. Mélanger vigoureusement (vortex) et laisser reposer les échantillons dilués, le calibrateur et les contrôles reconstitués 30 minutes à 2-8 °C (pour atteindre l'équilibre) avant de passer au pipetage.
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.

Détermination de l'isotype IgG

Il est recommandé de mesurer calibrateur, contrôles et échantillons en duplicata.

- 4a. Distribuer 100 µL de calibrateur dans les puits A1 et A2 (voir [Figure 1](#)).
- 4b. Distribuer 100 µL de contrôle moyen dans les puits B1 et B2, 100 µL de contrôle bas dans les puits C1 et C2 et 100 µL de contrôle négatif dans les puits D1 et D2 (voir [Figure 1](#)).
- 4c. Distribuer 100 µL de sérum dilué du patient No. 1 dans les puits E1 à E2 (voir [Figure 1](#)).
- 4d. Distribuer 100 µL de sérum dilué du patient No. 2 dans les puits F1 à F2 (voir [Figure 1](#)).

4e. Distribuer 100 µL de sérum dilué du patient No. x à y dans les puits suivants (voir [Figure 1](#)).

Détermination de l'isotype IgM

4f. Répéter les étapes 4a-e en utilisant les barrettes suivantes.

Incubation de l'échantillon et lavages

5. Couvrir la plaque à l'aide du film adhésif fourni et incuber à 2-8 °C pendant 2 heures ± 5 minutes. Ne pas agiter la microplaque.
6. Retirer 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.

Détermination des isotypes IgG et IgM

7. Ajouter 100 µL de marqueur enzymatique IgG ou IgM dans les puits respectifs.

Incubation avec le marqueur enzymatique, lavages et détection

8. Recouvrir la plaque 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 (OD) à 450 nm de chaque puits (calibrateur, contrôles et échantillons de patient).
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 :

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

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

Remarque : Pour un exemple de résultats, voir tableau 16. 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 auto-anticorps anti-GM1 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 la rapport de contrôle qualité contenu dans chaque coffret.

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

LIMITES

- Le test anti-GM1 Autoantibodies ELISA de BÜHLMANN n'a pas été validé pour les échantillons de plasmaphère.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision Intra-essai : 7.0 %. Elle a été calculée à partir des résultats de 12 valeurs de 2 échantillons lors d'un même essai. Les résultats sont reportés dans le tableau 17 sous forme de rapport (%) d'après la formule citée plus haut.

Précision Inter-essais : 11.10 %. Elle a été déterminée en mesurant différents échantillons pour les 3 gangliosides au cours de 20 essais différents. Les résultats sont reportés dans le tableau 18 sous forme de rapport (%) d'après la formule citée plus haut.

Limite de blanc (LoB) : 12 réplicats de tampon d'incubation ont été mesurés au cours d'un même essai. La limite de détection exprimée en % par rapport au calibrateur se trouve ≤ 5 %.

Linéarité du test : Le domaine de linéarité du test a été déterminé conformément à la directive EP06-A du CLSI. Le test est linéaire pour des ratios compris entre 20 et 100 %, soit dans l'intervalle diagnostique pertinent. Les ratios au-dessus de 100 % 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 anticorps anti-ganglioside spécifiques, IgM et/ou IgG ont été incubés durant une nuit avec l'antigène soluble correspondant en concentrations différentes et analysés ensuite au moyen de la procédure anti-GM1 Autoantibody ELISA. La spécificité des 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (données non reportées).

INTERFÉRENCES

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.

INTERVALLES DES REFERENCES ET RATIOS SEUILS

En accord avec les institutions mentionnées ci-dessous, nous avons établi un « cut off » (valeur seuil) clinique de 50 %. Les valeurs inférieures à 30 % doivent clairement être considérées comme négatives. Les valeurs des 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 auto-anticorps anti-GM1 conformément à la procédure d'utilisation du test. Les résultats des donneurs de sang sont présentés dans le tableau 19.

Guide d'interprétation des ratios :

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

Tableau 9

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.

ITALIANO

USO PREVISTO

Il anti-GM1 Autoantibodies ELISA, è un test per la determinazione quantitativa degli anticorpi IgG e IgM presenti nel siero umano diretti verso il ganglioside GM1 (rif. 1-7). Il test è concepito per la quantificazione di anticorpi di isotipo IgG e / o IgM.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

L' anti-GM1 Autoantibodies ELISA si basa sulla tecnica del dosaggio enzimatico immunometrico. I pozzetti della micropiastra fornita sono pre-coattati con il ganglioside GM1.

Il calibratore, i controlli ed i sieri dei pazienti vengono incubati nei pozzetti della micropiastra e gli anticorpi anti-GM1 (Ab) presenti vengono legati dai GM1 immobilizzati. Dopo il lavaggio delle sostanze non legate, gli anticorpi vengono rilevati con anticorpi anti IgG e/o IgM coniugati con perossidasi di rafano (HRP). 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 auto-anticorpi anti-GM1 legati nello step iniziale. Lo sviluppo della colorazione viene bloccato aggiungendo una soluzione bloccante a base di acido che trasforma la colorazione blu in gialla. L'intensità dell'assorbanza del colore è misurata a 450 nm.

L'assorbanza misurata è proporzionale al titolo di auto-anticorpi anti-GM1 presenti in un dato campione. I titoli di auto-anticorpi anti-GM1 sono espressi come rapporto percentuale (%) di un calibratore e possono essere assegnati a delle categorie di titolo (negativo, zona grigia, positivo, fortemente positivo).

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropiastra Precoattata con GM1	12 x 8- pozzetti	B-GM1-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 Liofilizzato con conservanti	1 flacone	B-GCO-CA	Aggiungere 1.5 mL di tampone di incubazione
Controllo negativo, basso e medio; Liofilizzato con conservanti	3 flaconi	B-GCO-CONSET	Aggiungere 1.5 mL di tampone di incubazione

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Marcatore enzimatico IgG Anticorpi Anti- IgG umane coniugati con HRP in un tampone a base proteica con conservanti	1 flacone 11 mL	B-GCO-ELG	Pronto all'uso
Marcatore enzimatico IgM Anticorpi Anti- IgM umane coniugati con HRP in un tampone a base proteica con conservanti	1 flacone 11 mL	B-GCO-ELM	Pronto all'uso
Substrato di TMB In tampone citrato	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

Tabella 10

CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

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

Tabella 11

PRECAUZIONI

Precauzioni di sicurezza

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

Precauzioni tecniche

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso
- **Residui rimasti nei pozzetti** sono causati dal processo di produzione. Questi residui vengono completamente eliminati dai lavaggi durante la procedura descritta e non compromettono in alcun modo i risultati (fare riferimento al punto 3 delle istruzioni per l'uso).
- **Preparare i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi.** I reagenti usati nei punti 3-9 devono essere refrigerati (2-8 °C) e mantenuti refrigerati durante la dispensazione e il lavaggio. Equilibrare il TMB a temperatura ambiente (18-28 °C).
- **Punti 3-9:** Utilizzare e mantenere i reagenti refrigerati (2-8 °C) durante la dispensazione. Raccomandazione: Preparare il tampone di lavaggio la sera prima di eseguire il test e posizionarlo in frigorifero per tutta la notte.
- **Processo di lavaggio per i punti 3, 6 e 9:** Le fasi di lavaggio sono fondamentali per la rimozione dai pozzetti della micropiastra dei residui derivanti dal processo di produzione (punto 3) nonché gli eventuali auto-anticorpi non legati (punti 6 e 9).
 - Eseguire sempre le fasi di lavaggio con il tampone di lavaggio freddo (2-8 °C).
 - Assicurarsi che tutti i pozzetti siano completamente vuoti dopo l'ultimo ciclo di lavaggio.
- **Punto 9:** Assicurarsi prima dell'uso che il substrato TMB raggiunga 18-28°C.
- **Punto 11:** Assicurarsi una buona agitazione della micropiastra durante l'incubazione con il Substrato TMB. A seconda del tipo di agitatore è consigliata una velocità di 400-600 rpm orbitali. La micropiastra deve essere agitata efficacemente, ma facendo in modo di evitare la fuoriuscita di liquido.
- Usando **dispositivi automatici per lavaggio/ aspirazione** della micropiastra, BÜHLMANN consiglia l'utilizzo della modalità: "plate mode"; dispensazione sequenziale in tutte le strip e successiva aspirazione.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Fare ogni tentativo per assicurarsi che tra i reagenti, i campioni o tra i pozzetti non vi siano contaminazioni incrociate.
- I micro pozzetti non possono essere riutilizzati.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso: 20 µL, 100 µL e 1000 µL.
- Provette di polistirene o polipropilene monouso per la preparazione di diluizioni del campione.
- Cilindro da 1000 mL per la ricostituzione del tampone di lavaggio.
- Dispositivo manuale o automatico per il lavaggio/ aspirazione della micropiastra.
- Carta assorbente.

- Agitatore orbitale per micropiastra.
- Lettore per micropiastra per le misurazioni dell'assorbanza a 450 nm.

PRELIEVO DEI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

- La procedura richiede <0.1 mL di sangue o <50 µL di siero, rispettivamente.
- I campioni lipemici possono essere evitati chiedendo ai pazienti di digiunare per almeno 12 ore prima del prelievo del campione.
- Prelevare il sangue in provette secche (senza anticoagulante), evitare l'emolisi, lasciare coagulare per un'ora, centrifugare per 10 minuti a circa 1500 x g a temperatura ambiente (18-28 °C), raccogliere il siero.
- BÜHLMANN raccomanda di aliquotare i campioni per evitare ripetuti cicli di congelamento / scongelamento.
- I campioni tenuti a ≤-20 °C sono stabili fino ad 4 mesi. Per periodi di conservazione più lunghi, (più di un anno) tenere i campioni a -70 °C.
- I campioni congelati devono essere scongelati completamente, quindi vortexati prima dell'utilizzo.

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

1. Diluire tutti i campioni 1:50 con il tampone d'incubazione. Usare ad es: 30 µL di siero + 1470 µL di tampone di incubazione (freddo 2-8 °C). Mescolare bene vortexando e lasciare i campioni, il calibratore e i controlli a stabilizzarsi per 30 minuti a 2-8 °C prima di passare alla dispensazione.
 2. **Preparare una piastra** con strip a sufficienza per effettuare il numero di test necessari. Estrarre le strip in eccedenza dal supporto e risigillarle **immediatamente** nella busta insieme all'essiccante. Conservare refrigerato.
- Importante: Utilizzare reagenti refrigerati dal punto 3. al punto 9.*
3. Lavare due volte i pozzetti coattati utilizzando almeno 300 µL di tampone di lavaggio **refrigerato** per pozzetto. Svotare i pozzetti e invertire con forza la piastra su carta assorbente assicurandosi che i pozzetti siano completamente vuoti.

Importante: Procedere immediatamente con i punti successivi.

Individuazione di isotipi IgG

Importante: Si consiglia di dosare calibratore, controlli e campione in duplicato.

- 4a. Dispensare 100 µL del calibratore nel pozzetto A1 e A2 (vedi [figura 1](#)).
- 4b. Dispensare 100 µL del controllo medio nel pozzetto B1 e B2 dispensare 100 µL del controllo basso nel pozzetto C1 e C2 e 100 µL del controllo negativo nel pozzetto D1 e D2 (vedi [figura 1](#)).
- 4c. Dispensare 100 µL del siero diluito del paziente 1 nei pozzetti E1 - E2 (vedi [figura 1](#)).
- 4d. Dispensare 100 µL del siero diluito del paziente 2 nei pozzetti F1 - F2 (vedi [figura 1](#)).
- 4e. Dispensare 100 µL del siero diluito del paziente x-y nei pozzetti successivi come illustrato in [figura 1](#).

Individuazione di isotipi IgM

4f. Ripetere i punti 4a-4e utilizzando i pozzetti successivi.

Incubazione e lavaggio del campione

- 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).
- Togliere il foglio protettivo. Svuotare i pozzetti e lavarli tre volte utilizzando almeno 300 μ L di tampone di lavaggio refrigerato (2-8 °C) per pozzetto. Svuotare i pozzetti e invertire la micropiastra su carta assorbente.

Individuazione di isotipi IgG e IgM

- Aggiungere 100 μ L di marcato enzimatico a tutti i pozzetti.

Incubazione con marcato enzimatici, lavaggio, individuazione

- Coprire la piastra con un foglio protettivo e incubare per 2 ore \pm 5 minuti a 2-8 °C (non agitare la piastra).
- Rimuovere il foglio protettivo. Svuotare i pozzetti e lavare tre volte utilizzando almeno 300 μ L di tampone di lavaggio refrigerato (2-8 °C) per pozzetto. Svuotare i pozzetti e colpire la piastra energicamente su carta assorbente.

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

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

STANDARDIZZAZIONE

Il calibratore incluso in questo kit è stato calibrato verso un pool di materiale di riferimento interno. È stato aggiustato ad un valore pari al 100 %.

RISULTATI E CALCOLO

Calcolo dei risultati:

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

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

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

Importante: I risultati presentati nella tabella 16 sono esempi. Calibratore e controlli devono essere utilizzati in ogni singola prova.

CONTROLLO DI QUALITÀ

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 disponibile in commercio non vi è nessun siero di controllo per gli auto-anticorpi anti-GM1 raccomandiamo l'utilizzo di un pool di sieri positivi per i controlli di qualità interni.

Il calibratore deve rientrare nell'intervallo di densità ottica stabilito. Tutti i controlli devono cadere entro i limiti di confidenza stabiliti (% Rapporto). I limiti di confidenza per il calibratore ed i controlli sono lotto specifici e sono stampati sul foglio di dati QC fornito con questo kit.

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 manualità, verificare quanto segue:

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

LIMITI DELLE PRESTAZIONI

- Il test anti-GM1 Autoantibodies ELISA non è stato convalidato per i campioni ottenuti da plasmaferesi.

PRESTAZIONI DEL DOSAGGIO

Precisione intra-dosaggio: 7.0 %. 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 tabella 17 come rapporto percentuale, (vedere sopra).

Precisione inter-dosaggio: 11.1 %. La precisione interdosaggio è stata determinata misurando due campioni di siero con tutti e 3 i gangliosidi in 20 sedute diverse. I valori sono forniti in tabella 18 come rapporto percentuale, (vedere sopra).

Limite del Bianco (LoB): Sono stati dosati 12 replicati di tampone di incubazione in un'unica seduta. Il limite di rilevazione espresso come rapporto percentuale del calibratore è stato calcolato $\leq 5 \%$.

Linearità del test: è stata determinata in conformità al protocollo EP06-A CLSI. Il sistema è risultato essere lineare nel range di rilevanza clinica tra un rapporto del 20 e 100 %. Risultati al di sopra del 100 % del rapporto 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 anticorpi specifici antiganglioside IgM e/o IgG sono stati incubati overnight con l'antigene solubile corrispondente e successivamente testati col dosaggio anti-GM1 Autoantibodies ELISA. La specificità del legame con l'anticorpo è stata dimostrata mediante l'inibizione dell'antigene corrispondente a concentrazioni tra 1 e 100 μ g/mL (dati non presenti).

INTERFERENZE

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).

INTERVALLO DI REFERENZIA E CUT-OFF

In cooperazione con diversi istituti, è stato stabilito un cut-off clinico del 50 %. Valori <30 % si possono classificare come decisamente negativi. 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 auto-anticorpi anti-GM1 secondo la procedura del test. I risultati dei donatori di sangue sono presentati nella tabella 19.

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

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

Tabella 12

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.

ESPAÑOL

USO PREVISTO

El enzoinmunoanálisis anti-GM1 Autoantibodies ELISA ha sido diseñado para realizar la cuantitativa determinación de los anticuerpos IgG e IgM de suero humano dirigidos contra GM1 (ref. 1-7). El ha sido diseñado para la cuantificar anticuerpos de los isotipos IgG e / o IgM (conjugato individual IgG y IgM; 2 resultados por paciente).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

La prueba anti-GM1 Autoantibodies ELISA se basa en la técnica de ensayo inmunométrico enzimático. Los pocillos de la placa de microtitulación suministrada están recubiertos con gangliósido GM1.

El calibrador, los controles y los sueros de paciente se incuban en los pocillos de microtitulación, con lo que los auto-anticuerpos anti-GM1 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 auto-anticuerpos anti-GM1 unidos a 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 auto-anticuerpos anti-GM1 presente en una determinada muestra. Los títulos de auto-anticuerpos anti-GM1 se expresan como relaciones porcentuales con respecto al calibrador y pueden asignarse a distintas categorías de título (negativo, zona gris, positivo y fuertemente positivo).

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Placa de microtitulación Previamente recubierta con GM1	12 x 8 pocillos	B-GM1-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
Controles negativo, bajo y medio Liofilizados con conservantes	3 viales	B-GCO-CONSET	Añadir 1,5 mL de tampón de incubación

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
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 Solución verde
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 Solución verde
Substrato 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- STS	Listo para usar Agente corrosivo

Tabla 13

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 / reconstituidos	
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	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 14

PRECAUCIONES

Precauciones de seguridad

- Tanto el calibrador (B-GCO-CA) como los controles (B-GCO-CONSET) de este kit contienen componentes de origen humano. Aunque se han ensayado con resultado negativo para antígeno de superficie del VHB y anticuerpos frente al VHC y el VIH 1/2, los reactivos se deben manejar como si pudieran transmitir infecciones y se deben manipular de conformidad con buenas prácticas de laboratorio utilizando las precauciones apropiadas.
- **Solución de interrupción:** La solución de parada (B-STs) contiene ácido sulfúrico (0,25 M). El reactivo es irritante para los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evitar el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Tras un contacto con los ojos o la piel, lavar inmediatamente con abundante agua.

- **Reactivos:** Evitar el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con cantidades generosas de agua; de lo contrario, se pueden producir irritación o quemaduras.
- **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 ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- El procedimiento requiere <0,1 mL de sangre y <50 µL de suero respectivamente.
- No deben utilizarse muestras lipémicas, hemolíticas o ictericas en este ensayo. Se pueden evitar las muestras lipémicas pidiendo a los pacientes que no coman como mínimo durante las 12 horas anteriores a la toma de la muestra.
- Recoja la sangre en tubos sencillos (sin anticoagulante), evite su hemólisis, déjela coagular durante una hora, centrifúguela durante 10 minutos a aproximadamente 1500 x g a temperatura ambiente (entre 18 y 28 °C) y recoja el suero.
- Recomendamos congelar alícuotas de las muestras de paciente cuando sea necesario conservar las muestras, a fin de evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.
- Conserve las muestras de suero a ≤ -20 °C durante un periodo de hasta 4 meses. Para la conservación a largo plazo recomendamos una temperatura de -70 °C (las muestras se mantienen estables durante >1 año). Las muestras congeladas deben ser descongeladas y mezcladas bien mediante vórtex antes de utilizarlas.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. **Diluya** todas las muestras de pacientes a estudiar en proporción 1:50 con tampón de incubación. Utilice 30 µL de suero + 1470 µL de tampón de incubación (¡frío! entre 2 y 8 °C!). Mezcle 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.
2. **Prepare un bastidor de placa** con el número de tiras necesario para ensayar las muestras de pacientes. Vuelva a sellar **inmediatamente** las tiras restantes dentro de la bolsa de aluminio junto con los paquetes de desecante. Consérvelas refrigeradas.

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

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

Nota: Proceda inmediatamente con los pasos siguientes.

Detección de isotipos de IgG

Nota: Se recomienda ensayar calibrador, controles y muestras por duplicado.

- 4a. Pipetee 100 µL de calibrador en el pocillo A1 y A2 (consulte la [figura 1](#)).
- 4b. Pipetee 100 µL de control medio en el pocillo B1 y B2, pipetee 100 µL de control bajo en el pocillo C1 y C2 y 100 µL de control negativo en el pocillo D1 y D2 (consulte la [figura 1](#)).
- 4c. Pipetee 100 µL de suero del paciente 1 diluido en los pocillos E1 – E2 (consulte la [figura 1](#)).
- 4d. Pipetee 100 µL de suero del paciente 2 diluido en los pocillos F2 – F2 (consulte la [figura 1](#)).
- 4e. Pipetee 100 µL de suero del paciente x-y diluido en los siguientes pocillos tal como se muestra en figura 1.

Determinación del isotipo IgM:

- 4f. Repite los pasos 4a-4e utilizando los siguientes pocillos.

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.

Detección de isotipos de IgG e IgM

7. Añada 100 µL de marcador enzimático de IgG o IgM a los respectivos pocillos.

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.

ESTANDARIZACIÓN

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 de pacientes).
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:

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

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

Nota: Los resultados que se presentan en la tabla 16 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 auto-anticuerpos anti-GM1 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 anti-GM1 Autoantibodies ELISA no ha sido validada para muestras de plasmaféresis.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Precisión intraensayo (dentro de una misma ejecución): 7.0 %. 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 aparecen recogidos en la tabla 17 como relaciones porcentuales, tal como se describe en la sección "resultados y cálculo".

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 11.1 %. La precisión inter-ensayo se ha determinado midiendo diferentes muestras de suero con los 3 gangliósidos y la mezcla de marcador de enzima (B-GCO-ELGM) en 20 pruebas diferentes. Los valores aparecen recogidos en la tabla 18 como relaciones porcentuales, tal como se describe en la sección "resultados y cálculo".

Límite para el blanco (LoB): Se ensayaron 12 duplicados de tampón de incubación en una única prueba. El límite de detección, expresado como cocientes % del calibrador, se calculó ≤ 5 %.

Linealidad del sistema: La linealidad del sistema ha sido evaluado según directiva CLSI EP06-A. El sistema está lineal entre 20 y 100 % cociente siendo la gama clínicamente lo más importante. Resultados arriba de 100% cocientes están determinados clínicamente correctos y pueden ser diluidos dentro de la gama lineal con una dilución adicional 1:5/1:10.

Especificidad: Durante la noche se incubaron muestras de suero de diferentes pacientes que contenían anticuerpos específicos IgM y/o IgG anti-gangliósido con el antígeno soluble correspondiente y posteriormente se probaron en el ensayo anti-GM1 Autoantibodies ELISA de acuerdo con el procedimiento del ensayo. La especificidad del ligamento con anticuerpo fue mostrada mediante

la inhibición del antígeno específico entre 1 y 100 $\mu\text{g/mL}$ (datos no mostrados).

INTERFERENCIAS

Parámetros de suero: Ninguna interferencia estaba encontrada para las siguientes sustancias hasta a las concentraciones siguientes: Triglicéridos (Intralipid®) 3000 mg/dL, bilirrubina conjugada 60 mg/dL, bilirrubina no conjugada 40 mg/dL o hemoglobina 400 mg/dL.

INTERVALOS DE REFERENCIA 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 sangre¹ (hombres y mujeres adultos entre 18 a 70 años de edad) y $n = 277$ muestras patológicas².

Los sueros fueron probados para anti-GM1 anticuerpos, según el procedimiento de análisis. Los resultados de los donantes de sangre se muestran en la tabla 19.

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

Interpretación clínica	Categorías Título/ Rapporto (%)
Negativo	<30
Zona gris	30-50
Cut-off	50
Positivo	$>50-100$
Fuertemente positiva	>100

Tabla 15

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.

TABLES/ TABELLEN/ TABLES/ TABELLE/ TABLAS

Microtiter plate set-up: IgG & IgM-conjugate

EK-GM1-GM													
		IgG		IgM									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Calibrator	CAL	CAL											
CTRL	CTRL Med	CTRL Med											
CTRL	CTRL low	CTRL low											
CTRL	CTRL Neg	CTRL Neg											
GM1													
GM1													
GM1													
GM1													

Figure 1

Example of Results

Enzyme label	Absorbance (OD ₄₅₀)		Ratio [%]		Category	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
Calibrator	2.397	2.269				
	2.449	2.343				
Calibrator Avg.	2.423	2.306	100.0	100.0		
Medium Control	1.612	1.583	67	69		
	1.543	1.658	64	72		
Me. Control Avg.	1.577	1.620	65	70		
Low Control	0.694	0.805	29	35		
	0.714	0.817	29	35		
Low Control Avg.	0.704	0.811	29	35		
Negative Control	0.055	0.091	2	4		
	0.064	0.090	3	4		
Neg. Control Avg.	0.059	0.090	2	4		
Sample 1	0.783	2.197	32	95		
	0.802	1.988	33	86	Grey zone	Positive
GM1	0.793	2,095	33	91		

Table 16

Intra-Assay Precision (Within-Run)

Anti-GM1	Serum	Mean [% Ratio]	SD [% Ratio]	CV [%]
Enzyme-Label IgG	1	116	11.1	9.6
	2	60	5.0	8.3
	3	150	11.2	7.5
Enzyme-Label IgM	1	78	5.3	6.8
	2	60	2.0	3.4
	3	105	6.6	6.3
Mean IgG/IgM				7.0

Table 17

Inter-Assay Precision (Run-to-Run)

GM1	Serum	Mean [% Ratio]	SD [% Ratio]	CV [%]
Enzym-label IgG	1	134	11.3	8.5
	2	53	4.1	7.8
	3	132	31.4	23.9
Enzym-label IgM	1	92	8.3	9.1
	2	61	5.1	8.4
	3	95	8.5	8.9
Mean IgG/IgM				11.1

Table 18

Blood Donors

Category	anti-GM1-auto-antibodies (%)	
	IgM	IgG
Negative	95	96
Greyzone	3	2
Positive	2	2
Strongly positive	0	0

Table 19

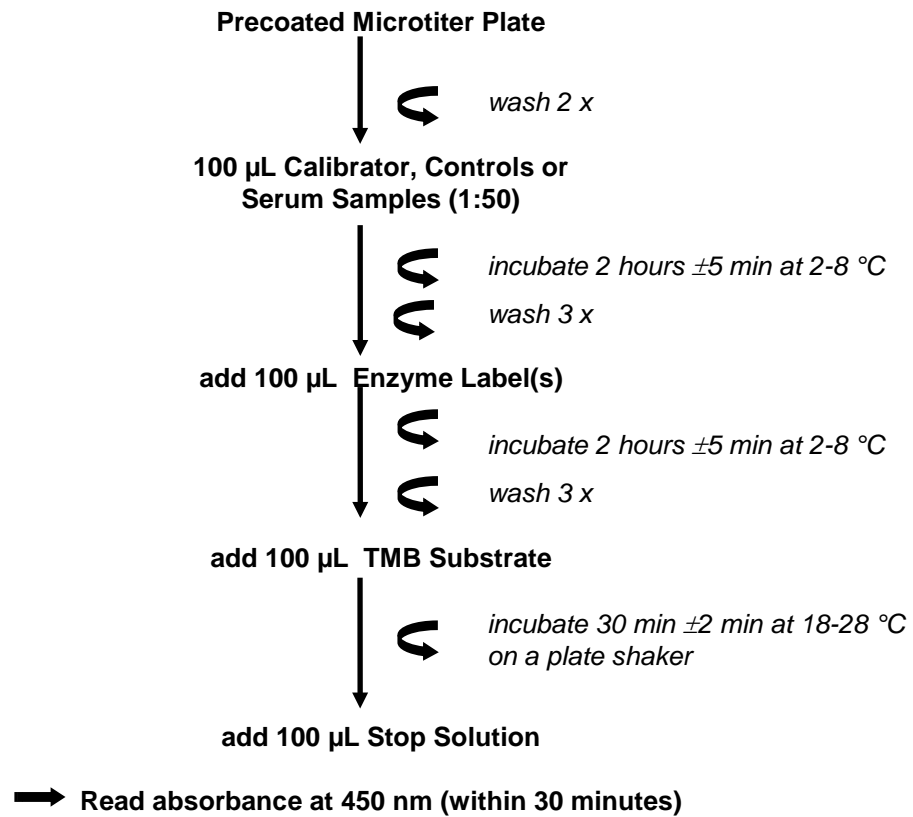
Legend table 19: Distribution frequency of anti-GM1 antibodies (%) tested with EK-GM1-GM and classified into Titer categories (n = 100); calculated for IgG and IgM isotype:

- Negative : 95-96 % of blood donors
- Grey zone: 2-3 % of blood donors
- Positive: 2 % of blood donors
- Strongly positive: 0 % of blood donors

REFERENCES / LITERATURREFERENZEN / REFERENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS



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

anti-GM1 Autoantibodies 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 Placa de microtitulación
BUF WASH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Waschpuffer-konzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage Tampone di lavaggio concentrato (x10) Tampón de lavado concentrado (x10)
BUF INC	Incubation Buffer Inkubationspuffer Tampon d'incubation Tampone di incubazione Tampón de incubación

Symbol	Explanation
CONTROL -	Negative Control Negativkontrolle Contrôle négatif Controllo negativo Control negativo
CONTROL L	Low Control Kontrolle tief Contrôle faible Controllo basso Control bajo
CONTROL M	Medium Control Kontrolle mittel Contrôle moyen Controllo medio Control medio
CAL	Calibrator Kalibrator Calibrateur Calibratore Calibrador
EL IgG	Enzyme Label IgG Enzymmarker-IgG Marqueur enzymatique IgG Marcatore enzimatico IgG Marcador enzimático de IgG
EL IgM	Enzyme Label IgM Enzymmarker-IgM Marqueur enzymatique IgM Marcatore enzimatico IgM Marcador enzimático de IgM
SUBS TMB	TMB Substrate TMB Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato TMB
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione bloccante Solución de interrupción

