



# Ganglioside Antibody ELISA

IVD

## PRODUCT INSERT

<b>REF</b>	1180M anti-GM <sub>1</sub> IgM 96 Determinations
<b>REF</b>	1180G anti-GM <sub>1</sub> IgG 96 Determinations
<b>REF</b>	1181M anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgM 96 Determinations
<b>REF</b>	1181G anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgG 96 Determinations
<b>REF</b>	1183M anti-GD <sub>1b</sub> IgM 96 Determinations
<b>REF</b>	1183G anti-GD <sub>1b</sub> IgG 96 Determinations
<b>REF</b>	1184M anti-GQ <sub>1b</sub> IgM 96 Determinations
<b>REF</b>	1184G anti-GQ <sub>1b</sub> IgG 96 Determinations
<b>REF</b>	1185M anti-Galactocerebroside IgM 96 Determinations
<b>REF</b>	1185G anti-Galactocerebroside IgG 96 Determinations
<b>REF</b>	1186M anti-GD <sub>1a</sub> IgM 96 Determinations
<b>REF</b>	1186G anti-GD <sub>1a</sub> IgG 96 Determinations

## INTENDED USE

These enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are intended for the semi-quantitative detection of antibodies to gangliosides in human serum to be used as adjunct to clinical indications of patients with motor-neuron disorders / neuropathies.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Gangliosides are acidic glycosphingolipids localized in the outer layer of plasma membranes and occur in a variety of motor-neuron disorders / neuropathies. Neuropathies can be generally debilitating, and sometimes fatal if they affect vital organ function. Neuropathies can be hereditary conditions, or result from an infection or an autoimmune disease. Various neuropathies often present with similar symptoms and hence are difficult to diagnose. Accurate diagnosis is important since proper treatment modality and prognosis may differ depending on the particular neuropathy<sup>1</sup>.

Some neuropathies, Guillain-Barré Syndrome (GBS) in particular, are better characterized than others. GBS refers to an autoimmune disorder characterized by rapid limb weakness and loss of tendon reflex and sensory dysfunctions. GBS is an acute inflammatory neuropathy. Patients with GBS elicit antibodies to GM<sub>1</sub> gangliosides<sup>2,3</sup>. These antibodies are reported in patients with severe axonal damage and are directed against the galactose-galactosamine structure of the carbohydrate portion of the molecule<sup>4</sup>. GBS is a typical post-infectious autoimmune disorder. More than two thirds of GBS patients have an antecedent infection, usually mediated by a virus or bacterium. *Cytomegalovirus*, associated with upper-respiratory tract infections, and *Campylobacter jejunii*, associated with gastroenteritis, initiate a cross reactive immune response against gangliosides, resulting in immune complex deposition and demyelination of nerves leading to slow nerve conduction or blockage<sup>5</sup>.

GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> and Asialo GM<sub>1</sub> share the same terminal Gal (β1-3) GalNAc residues. Increased titers of IgM antibodies against GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> and Asialo GM<sub>1</sub> are found to co-exist in several types of motor-neuropathies<sup>6</sup>. Among these, the presence of anti-GM<sub>1</sub> antibodies are preferentially associated with multi-focal motor neuropathies and are never observed in lower motor neuron diseases<sup>7</sup>. This observation distinguishes them from anti-GD<sub>1b</sub> and anti-Asialo GM<sub>1</sub> antibodies, which are preferentially observed in cases with lower motor neuropathies.

Serological profiles for anti-ganglioside antibodies in treated and untreated GBS patients have been reported<sup>8</sup>. Anti-GM<sub>1</sub> IgG and anti-GD<sub>1a</sub> IgM titers peaked around forty (40) and ninety (90) days respectively following treatment. Anti-GM<sub>1</sub> IgG titers decreased following intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment. The clinical utility of these antibodies is demonstrated in the correlation of antibody peaks with higher disability scores and worse clinical outcome<sup>8</sup>. Anti-GD<sub>1a</sub> IgG antibodies are also found in 23% of patients with Multiple Sclerosis (MS) and 18% with Optic Neuritis (ON)<sup>9</sup>. The augmented GD<sub>1a</sub> IgG responses can be used as a discriminatory feature between MS and GBS<sup>9</sup>. Immunopathological studies suggest that the target of immune attack is different in the various subtypes of GBS. In Acute Motor Axonal Neuropathy, the attack is directed against the axolemma and nodes of Ranvier.

EN

Antibodies to GD<sub>1a</sub> selectively bind to motor nerve nodes rather than sensory nerve nodes of Ranvier, suggesting their pathogenic role<sup>10</sup>.

Anti-GM<sub>1</sub> and anti-GD<sub>1b</sub> antibodies have also been reported in patients with multiple sclerosis (MS), systemic lupus erythematosus (SLE), Alzheimer's disease and certain normal individuals. It is important to note that anti-GM<sub>1</sub> and related antibody levels with a titer greater than 1:800 are strongly and specifically associated with lower motor neuron disease, sensory-motor neuropathy and motorneuropathy<sup>11</sup>.

Autoimmune responses in patients suffering from other neuropathies can be directed against GQ<sub>1b</sub> and sulfatides gangliosides<sup>7</sup>. GQ<sub>1b</sub> antibodies are associated with Miller Fisher syndrome, an unusual variant of GBS, afflicting patients with *ophthalmoplegia*, *ataxia* and *areflexia* and often follow an infectious episode. Anti-galactocerebroside antibodies appear to be closely related to anti-sulfatides antibodies and have been observed in patients with *leprous neuritis*, *African trypanosomiasis* and *mucocutaneous leishmaniasis*.

Ganglioside antibodies of clinical significance are usually of IgM and/or IgG isotypes. It has been demonstrated that plasma exchange is an effective therapeutic measure, provided it is initiated not later than two weeks after the onset of symptoms<sup>12</sup>. Hence, laboratory tests based on early detection of antibodies to various gangliosides can effectively complement such therapies.

## PRINCIPLES OF PROCEDURES

The ImmuLisa™ anti-ganglioside antibody assays are performed as solid phase enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Purified antigen-coated microwells are used to incubate Controls, Calibrators and patient serum samples to allow specific antibodies present in serum to bind to the respective antigen. Unbound antibodies and other serum proteins are removed by washing the microwells. After addition and incubation with an enzyme labeled anti-human conjugate, unbound conjugate is removed by washing the microwells. The addition of pNPP enzyme substrate to the microwells results in a color change produced by the conversion of the substrate to a yellow reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read on a spectrophotometer at 405 nm. Antibody concentration range is expressed in ELISA Units per milliliter (EU/ml) on the Calibrator and Positive Control. These values are used to determine compliance with assay quality controls and to determine qualitative results. Positive specimen results should be expressed in titer.

## REAGENTS

### Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Do not use if reagents exhibit turbidity or if a precipitate is present. **All reagents must be kept at 2-8°C throughout their use**, except Enzyme Substrate, which must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use. When stored at 2-8°C, reconstituted Wash Buffer is stable until kit expiration date.

### Precautions

All human derived components have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>13</sup>.

**WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources. If additional reagents are required, use only components with the same lot number from Immco Diagnostics Inc. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use beyond expiration date on the label.

EN

### Materials provided

<b>Product</b>	<b>REF</b>
anti-GM <sub>1</sub> IgM	1180M
anti-GM <sub>1</sub> IgG	1180G
anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgM	1181M
anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgG	1181G
anti-GD <sub>1b</sub> IgM	1183M
anti-GD <sub>1b</sub> IgG	1183G
anti-GQ <sub>1b</sub> IgM	1184M
anti-GQ <sub>1b</sub> IgG	1184G
anti-Galactocerebroside IgM	1185M
anti-Galactocerebroside IgG	1185G
anti-GD <sub>1a</sub> IgM	1186M
anti-GD <sub>1a</sub> IgG	1186G

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> †	<b>Microplate</b> with individual breakaway microwells coated with purified antigen. Ganglioside antigen is indicated on label.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> * †	Ready to use <b>Calibrator</b> ( <i>green cap</i> ). Derived from human serum containing antibodies to respective gangliosides. Concentration in EU/ml is printed on the vial label.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL +</b> * †	Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Contains human serum positive for respective ganglioside antibody.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Ready to use <b>Negative Control</b> ( <i>white cap</i> ). Contains ganglioside antibody negative human serum.
1 x 12 ml	<b>CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> * †	Ready to use <b>anti-human IgM or IgG Alk. Phos. Conjugate</b> . Color coded pink.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Ready to use <b>Serum Diluent</b> . Color coded blue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Ready to use <b>Enzyme Substrate</b> . Contains pNPP. <b>Protect from light.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Ready to use <b>Stop Solution</b>
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	Powder <b>Wash Buffer</b> . Reconstitute to one liter each.

\* Contains <0.1% NaN<sub>3</sub>

† The specific microplate antigen and antibody/isotype for each kit in this product family are indicated below:

**REF** 1180M contains microplate for GM<sub>1</sub>, calibrator and control for GM<sub>1</sub> IgM and IgM conjugate

**REF** 1180G contains microplate for GM<sub>1</sub>, calibrator and control for GM<sub>1</sub> IgG and IgG conjugate

**REF** 1181M contains microplate for Asialo GM<sub>1</sub>, calibrator and control for Asialo GM<sub>1</sub> IgM and IgM conjugate

EN

**REF** 1181G contains microplate for Asialo GM<sub>1</sub>, calibrator and control for Asialo GM<sub>1</sub> IgG and IgG conjugate

**REF** 1183M contains microplate for GD<sub>1b</sub>, calibrator and control for GD<sub>1b</sub> IgM and IgM conjugate

**REF** 1183G contains microplate for GD<sub>1b</sub>, calibrator and control for GD<sub>1b</sub> IgG and IgG conjugate

**REF** 1184M contains microplate for GQ<sub>1b</sub>, calibrator and control for GQ<sub>1b</sub> IgM and IgM conjugate

**REF** 1184G contains microplate for GQ<sub>1b</sub>, calibrator and control for GQ<sub>1b</sub> IgG and IgG conjugate

**REF** 1185M contains microplate for Galactocerebroside, calibrator and control for Galactocerebroside IgM and IgM conjugate

**REF** 1185G contains microplate for Galactocerebroside, calibrator and control for Galactocerebroside IgG and IgG conjugate

**REF** 1186M contains microplate for GD<sub>1a</sub>, calibrator and control for GD<sub>1a</sub> IgM and IgM conjugate

**REF** 1186G contains microplate for GD<sub>1a</sub>, calibrator and control for GD<sub>1a</sub> IgG and IgG conjugate

#### **Symbols used on labels:**

**LOT** Lot number

**REF** Catalog number

 Use by

 Storage temperature

 Read instructions for use

**IVD** In vitro diagnostic use

 Manufacturer

 Number of Tests

#### **Materials Required But Not Provided**

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

#### **SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

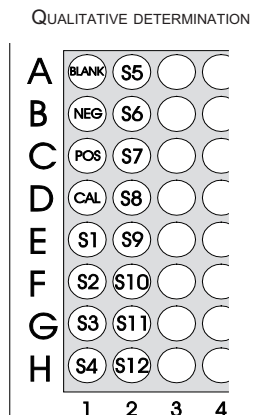
## PROCEDURE

### Procedural Notes

- Read Product Insert carefully before starting the assay.
- Remove required microwell strips from pouch and, to prevent condensation, immediately return unused microwells in sealed pouch to refrigerator.
- **Let Enzyme Substrate equilibrate to room temperature prior to use. All other reagents, including wash buffer should be kept at 2-8°C and used cold.** Return unused samples and reagents to refrigerator immediately after use.
- Dilute patient samples immediately prior to starting the assay and store dilutions at 2-8°C until use.
- Prepare wash buffer and equilibrate its temperature to 2-8°C. Wash buffer cannot be prepared just prior to running the assay.
- **Good washing technique is critical and automated microplate washer is recommended.** If washing is performed manually, adequate washing can be accomplished by directing a forceful stream of **cold** wash buffer across all microwells with a wide tip wash bottle. However, manual washing is not recommended for this assay.
- Use multichannel pipette capable of pipetting simultaneously into 8 well strip. This speeds the process and provides for more uniform incubation times.
- Careful control of timing is important for all steps. Pipetting of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence and start time of all incubations beginning with the completion of reagent addition. Each incubation period must be timed independently from previous one.

### Test Method

- Step 1** Maintain 2-8°C temperature of all reagents (except Enzyme Substrate) and microtiter plate strips through Step 11 of the assay.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells according to the following figure. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** Prepare a **1:101** dilution of the patient serum samples by mixing **5 µl** of serum samples with **500 µl** of **cold** Serum Diluent.
- Step 4** Remove the required microwells from the **cold** pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place microwell strips into the extra provided holder.  
**Note:** While performing Steps 1 through 5, microplate should be kept on ice packs to maintain 2-8°C temperature.  
**Note:** Pipette **100 µl** of **cold** Serum Diluent into one microwell as a reagent blank. All Steps should be performed rapidly to avoid warming of the microwells and serum dilutions.
- Step 5** Pipette **100 µl** of Ready to Use **cold** Calibrator, Positive and Negative Controls into microwells. Pipette **100 µl** of **cold** diluted samples.



EN

- Step 6** Incubate 16-18 hours (overnight) at 2-8°C.
- Step 7** Wash **4x** with **cold** wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Aspirate contents of each well. Invert microplate and tap gently on absorbent paper towels. Keep inverted for ~1 minute to drain all liquid from microwells. **Note: Do not tap vigorously, tap lightly to remove excess liquid from wells. Keep all strips cold during this operation.**
- Step 8** Pipette **100 µl** of **cold** Conjugate into microwells.
- Step 9** Incubate 2 hours at 2-8°C.
- Step 10** Wash all microwells as in Step 7.
- Step 11** Pipette **100 µl** of **room temperature equilibrated Enzyme Substrate** into each microwell in the same order and timing as the conjugate.
- Step 12** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 13** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within one hour of adding Stop Solution.
- Step 14** Zero ELISA reader against reagent blank. Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/630nm dual wavelength microplate reader.

### Quality Control

Reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The OD reading of the reagent blank should be <0.3. The EU/ml of the Positive Control should be within the range indicated on the label. The Negative Control must be < 20 EU/ml. The OD of the Calibrator must be greater than that of the Negative Control and less than that of the Positive Control. For improved reproducibility samples may be run in duplicate and EU/ml calculated using the mean of the OD readings for the duplicate wells.

### RESULTS

#### Calculations

Concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

#### 1. Qualitative

Results obtained by this method should be reported as positive or negative.

**Abs. of Test Sample**

----- X EU/ml of Calibrator = EU/ml Test Sample

**Abs. of Calibrator**

#### Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values. These may vary with the population examined.

**Anti-Ganglioside Value Interpretation**

< 20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

#### 2. Quantitative

Quantitative values may be determined for samples testing positive using the qualitative method. Quantitative values for positive specimens should be expressed in titer of the specimen.<sup>14</sup> To determine the titer of positive patients, make four-fold serial dilutions of the patient sample starting from 1:101 and perform the assay as indicated in Test Method. The last dilution that has an EU/ml greater than 25 is the endpoint titer of the patient. A table has been provided below to indicate proper preparation of the four-fold dilution series.

EN

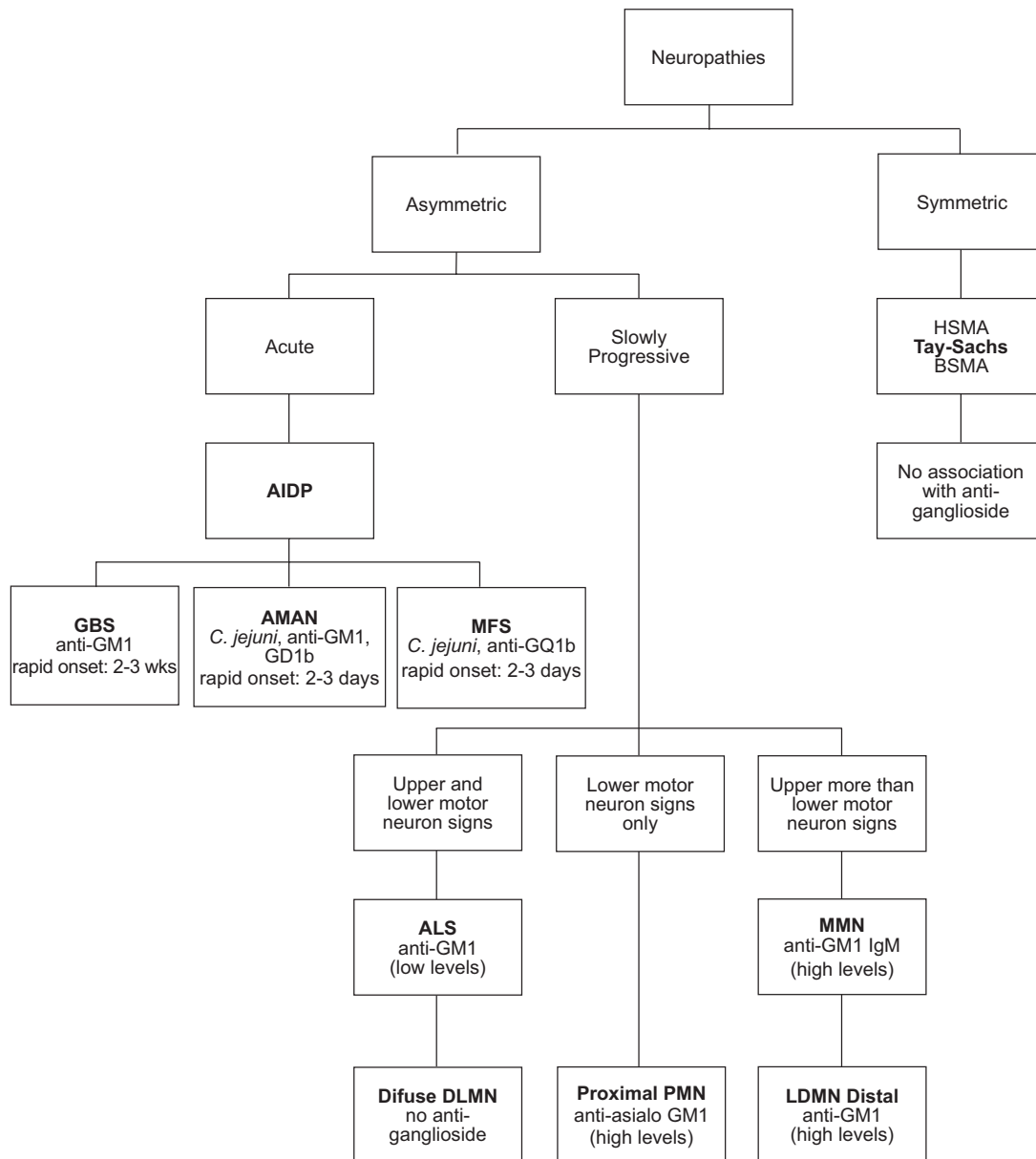
<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Serum</b>	10 µl			
	+			
<b>Buffered Diluent</b>	1000 µl	800 µl	800 µl	800 µl
		↻	↻	↻
<b>Transfer</b>	200 µl	200 µl	200 µl	
<b>Final dilution</b>	1:100	~1:400	~1:1600	~1:6400

### **LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

Test results obtained by this assay alone are not diagnostic and should be considered in conjunction with the clinical presentation of the patient. Any test with borderline reactivity should be retested to confirm the result. It is also recommended that patients with borderline results be retested after a subsequent blood draw. Immunosuppressive therapy, plasmapheresis, initiation or alteration in the treatment of a patient with neuropathy should not be performed on the basis of positive reaction in this assay. All clinical observations and, most importantly, electrophysiological data such as motor nerve conduction block or other related symptoms should be taken into consideration along with the results of the ganglioside assay. Serum from some patients with motor neuropathies may be negative for certain gangliosides. Such patients should be tested for autoantibodies to other gangliosides.

### **EXPECTED VALUES**

The following flow chart depicts the presence of anti-ganglioside antibodies in certain well characterized neuropathies<sup>1,7</sup>. This chart is only to assist in the differential diagnosis and should not be used as conclusive information of all neuropathies listed. See limitations of the procedure.



**Legend**

- GBS = Guillain-Barré Syndrome
- AMAN = Acute Motor Axonal Neuropathy
- MFS = Miller-Fisher Syndrome
- ALS = Amyotrophic Lateral Sclerosis
- MMN = Multifocal Motor Neuropathy
- HSMA = Hereditary Spinal Muscular Atrophy
- LDMN = Lower Distal Motor Neuron Syndrome
- PMN = Proximal Motor Neuron Syndrome
- DLMN = Diffuse Lower Motor Neuron Syndrome
- AIDP = Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

## Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά των γαγγλιοσιδίων

IVD

### ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

<b>REF</b> 1180M	<i>IgM</i> αντισώματα κατά του $GM_1$ , 96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b> 1180G	<i>IgG</i> αντισώματα κατά του $GM_1$ , 96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b> 1181M	<i>IgM</i> αντισώματα κατά του <i>Asialo</i> $GM_1$ , 96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b> 1181G	<i>IgG</i> αντισώματα κατά του <i>Asialo</i> $GM_1$ , 96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b> 1183M	<i>IgM</i> αντισώματα κατά του $GD_{1b}$ , 96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b> 1183G	<i>IgG</i> αντισώματα κατά του $GD_{1b}$ , 96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b> 1184M	<i>IgM</i> αντισώματα κατά του $GQ_{1b}$ , 96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b> 1184G	<i>IgG</i> αντισώματα κατά του $GQ_{1b}$ , 96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b> 1185M	<i>IgM</i> αντισώματα κατά του γαλακτοσερεβροσιδίου 96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b> 1185G	<i>IgG</i> αντισώματα κατά του γαλακτοσερεβροσιδίου 96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b> 1186M	<i>IgM</i> αντισώματα κατά του $GD_{1a}$ , 96 Προσδιορισμοί
<b>REF</b> 1186G	<i>IgG</i> αντισώματα κατά του $GD_{1a}$ , 96 Προσδιορισμοί

### ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Αυτές οι μέθοδοι ενζυμικού ανοσοπροσοφνητικού προσδιορισμού (ELISA) προορίζονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων κατά των γαγγλιοσιδίων σε ορό ανθρώπου και χρησιμοποιούνται ως επικουρικό μέσο των κλινικών ενδείξεων των ασθενών με διαταραχές του κινητικού νευρώνα / νευροπάθειες.

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα γαγγλιοσίδια είναι όξινα γλυκοσφιγγολιπίδια που εντοπίζονται στην εξωτερική στιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών και εμφανίζονται σε διάφορες διαταραχές του κινητικού νευρώνα / νευροπάθειες. Οι νευροπάθειες γενικά μπορούν να προκαλέσουν καταβολή και, εάν επηρεάσουν τη λειτουργία κάποιου ζωτικού οργάνου, ενίοτε μπορούν να αποβούν μοιραίες. Οι νευροπάθειες μπορεί να είναι κληρονομικές καταστάσεις ή να είναι αποτέλεσμα λοίμωξης ή αυτοάνοσης νόσου. Πολλές νευροπάθειες εκδηλώνονται συχνά με παρόμοια συμπτώματα και επομένως είναι δύσκολο να διαγνωστούν. Η ακριβής διάγνωση είναι σημαντική δεδομένου ότι ο κατάλληλος τρόπος θεραπείας και η πρόγνωση μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την κάθε νευροπάθεια<sup>1</sup>.

Ορισμένες νευροπάθειες, και ιδιαίτερα το σύνδρομο Guillain-Barré (GBS), έχουν χαρακτηριστεί καλύτερα από άλλες. Το GBS αναφέρεται σε μια αυτοάνοση διαταραχή που χαρακτηρίζεται από ταχεία εξασθένηση των άκρων, απώλεια των τενόντιων αντανακλαστικών και αισθητηριακές δυσλειτουργίες. Το GBS είναι μια οξεία φλεγμονώδης νευροπάθεια. Στους ασθενείς με GBS παράγονται αντισώματα έναντι των γαγγλιοσιδίων  $GM_1$ <sup>2,3</sup>. Τα αντισώματα αυτά εμφανίζονται σε ασθενείς με σοβαρή αξονική βλάβη και κατευθύνονται έναντι της δομής γαλακτόξης-γαλακτοζαμίνης του υδατανθρακικού τμήματος του μορίου<sup>4</sup>. Το GBS είναι μια τυπική, μεταφλεγμονώδης, αυτοάνοση διαταραχή. Περισσότερα από τα δύο τρίτα των ασθενών με GBS έχουν μια προγενέστερη λοίμωξη, συνήθως ιογενή ή βακτηριακή. Ο *κυτταρομεγαλοϊός*, που σχετίζεται με λοιμώξεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού και το *Campylobacter jejunii*, που σχετίζεται με γαστρεντερίτιδα, πυροδοτούν μια ανοσολογική απόκριση διασταυρούμενης αντιδραστικότητας έναντι των γαγγλιοσιδίων, με αποτέλεσμα την εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων και την απομυελίνωση των νευρών, καταλήγοντας έτσι σε βραδεία αγωγή νευρικών ώσεων ή σε αποκλεισμό τους<sup>5</sup>.

Τα γαγγλιοσίδια  $GM_1$ ,  $GD_{1a}$ ,  $GD_{1b}$  και *Asialo*  $GM_1$  έχουν τις ίδιες τελικές ομάδες Gal ( $\beta$ 1-3) GalNAc. Αυξημένοι τίτλοι *IgM* αντισωμάτων κατά των γαγγλιοσιδίων  $GM_1$ ,  $GD_{1a}$ ,  $GD_{1b}$  και *Asialo*  $GM_1$  έχει βρεθεί ότι συνυπάρχουν σε διάφορους τύπους κινητικών νευροπαθειών<sup>6</sup>. Μεταξύ αυτών, η παρουσία αντισωμάτων αντι- $GM_1$  σχετίζεται συχνότερα με πολυεστιακές κινητικές νευροπάθειες και δεν παρατηρείται ποτέ σε νόσους του κατώτερου<sup>1</sup> κινητικού νευρώνα<sup>7</sup>. Η παρατήρηση αυτή τα διαχωρίζει από τα αντισώματα κατά των  $GD_{1b}$  και *Asialo*  $GM_1$ , τα οποία παρατηρούνται συχνότερα σε περιπτώσεις νευροπαθειών του κατώτερου κινητικού νευρώνα.

Έχουν αναφερθεί ορολογικά προφίλ για αντισώματα κατά των γαγγλιοσιδίων σε ασθενείς με GBS που έχουν λάβει ή δεν έχουν λάβει θεραπεία<sup>8</sup>. Οι τίτλοι των *IgG* αντισωμάτων αντι- $GM_1$  και των *IgM* αντισωμάτων αντι- $GD_{1a}$  έφθασαν στη μέγιστη τιμή τους περίπου έπειτα από σαράντα (40) και ενενήντα (90) ημέρες αντίστοιχα μετά τη θεραπεία. Οι τίτλοι των *IgG* αντισωμάτων αντι- $GM_1$  μειώθηκαν έπειτα από θεραπεία με ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη

(Ivlg). Η κλινική χρησιμότητα αυτών των αντισωμάτων παρουσιάζεται στη συσχέτιση των υψηλότερων τίτλων των αντισωμάτων με υψηλότερες βαθμολογίες αναπηρίας και με χειρότερη κλινική έκβαση<sup>8</sup>. Τα IgG αντισώματα αντι-GD<sup>1a</sup> απαντούν επίσης στο 23% των ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ) και στο 18% των ασθενών με οπτική νευρίτιδα (ΟΝ)<sup>9</sup>. Οι αυξημένες IgG αποκρίσεις στο αντιγόνο GD<sup>1a</sup> μπορούν να χρησιμεύσουν ως χαρακτηριστικό διάκρισης μεταξύ ΣΚΠ και GBS<sup>9</sup>. Ανοσοπαθολογικές μελέτες<sup>1a</sup> υποδεικνύουν ότι ο στόχος της ανοσολογικής προσβολής είναι διαφορετικός στους διάφορους υποτύπους του GBS. Στην οξεία αξονική κινητική νευροπάθεια η προσβολή στρέφεται κατά του νευριλήμματος και των κόμβων του Ranvier. Τα αντισώματα κατά του GD<sup>1a</sup> δεσμεύονται επιλεκτικά στους κινητικούς νευρικούς κόμβους αντί για τους αισθητικούς κόμβους του Ranvier<sup>1a</sup>, υποδηλώνοντας έτσι τον παθογενετικό τους ρόλο<sup>10</sup>.

Αντι-GM<sup>1</sup> και αντι-GD<sup>1b</sup> αντισώματα έχουν επίσης αναφερθεί σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ), με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (ΣΕΛ), με νόσο Alzheimer και σε ορισμένα φυσιολογικά άτομα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι επίπεδα αντι-GM<sup>1</sup> και άλλων σχετικών αντισωμάτων με τίτλο μεγαλύτερο από 1:800 σχετίζονται στενά και ειδικά με τη νόσο του κατώτερου κινητικού νευρώνα, με την αισθητική-κινητική νευροπάθεια και με την κινητική νευροπάθεια<sup>11</sup>.

Οι αυτοάνοσες αποκρίσεις σε ασθενείς που πάσχουν από άλλες νευροπάθειες μπορούν να κατευθυνθούν κατά του GQ<sup>1b</sup> και των γαγγλιοσιδίων των σουλφατιδίων<sup>7</sup>. Τα αντισώματα κατά του GQ<sup>1b</sup> σχετίζονται με το σύνδρομο Miller Fisher, μια ασυνήθιστη παραλλαγή του GBS, η οποία εκδηλώνεται με *οφθαλμοπληγία, αταξία και απουσία αντανακλαστικών* και η οποία συχνά ακολουθεί μια λοίμωξη. Τα αντισώματα κατά του γαλακτοσερεβροσιδίου φαίνεται ότι σχετίζονται στενά με τα αντισώματα κατά των σουλφατιδίων και έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με *λεπρωσική νευρίτιδα, αφρικανική τρυπανοσωμίαση και βλεννογονοδερματική λείσμανίαση*.

Τα αντισώματα κατά των γαγγλιοσιδίων ανήκουν συνήθως στους ισότυπους IgM και/ή IgG. Έχει βρεθεί ότι η ανταλλαγή πλάσματος είναι ένα αποτελεσματικό θεραπευτικό μέτρο, εφόσον αυτή ξεκινήσει εντός δύο εβδομάδων από την αρχική εμφάνιση των συμπτωμάτων<sup>12</sup>. Επομένως, οι εργαστηριακές εξετάσεις που βασίζονται στην έγκαιρη ανίχνευση αντισωμάτων κατά των διαφόρων γαγγλιοσιδίων μπορούν να συμπληρώσουν αποτελεσματικά τέτοιου είδους θεραπείες.

## ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Οι αναλύσεις αντισωμάτων κατά των γαγγλιοσιδίων της ImmuLisa™ διενεργούνται ως ενζυμικές ανοσοπροσοφορικές αναλύσεις (ELISA) στερεάς φάσης. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται σε επικαλυμμένες με κεκαθαρισμένο αντιγόνο μικροκυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση των ειδικών αντισωμάτων του ορού στο αντίστοιχο αντιγόνο. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Μετά την προσθήκη και την επώαση με ένα σημασμένο με ένζυμο συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης, το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Η προσθήκη ενζυμικού υποστρώματος pNPP στις μικροκυψελίδες έχει σαν αποτέλεσμα μια αλλαγή χρώματος που δημιουργείται από τη μετατροπή του υποστρώματος σε ένα κίτρινο προϊόν αντίδρασης Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Το εύρος της συγκέντρωσης του αντισώματος εκφράζεται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml) στο βαθμονομητή και το διάλυμα θετικού ελέγχου. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της συμφωνίας με τα διαλύματα ελέγχου ποιότητας της ανάλυσης και τον προσδιορισμό των ποιοτικών αποτελεσμάτων. Τα θετικά αποτελέσματα των δειγμάτων πρέπει να εκφράζονται σε τίτλο.

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

### Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.** Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν είναι θολά ή εάν περιέχουν ίζημα. **Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C καθόλη τη διάρκεια της χρήσης τους**, εκτός από το ενζυμικό υποστρώμα, το οποίο πρέπει να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

## Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, τη χορήγηση και την απόρριψη των υλικών αυτών<sup>13</sup>.

**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ** – Το αζίδιο του νατρίου (NaN<sub>3</sub>) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης. Εάν απαιτούνται επιπλέον αντιδραστήρια, χρησιμοποιήστε αποκλειστικά συστατικά με τον ίδιο αριθμό παρτίδας από τη Immco Diagnostics Inc. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μικροβιακής ή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό τους. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

## Υλικά που παρέχονται

Προϊόν	REF
Immulin <sup>™</sup> IgM αντισώματα κατά του GM <sub>1</sub>	1180M
Immulin <sup>™</sup> IgG αντισώματα κατά του GM <sub>1</sub>	1180G
Immulin <sup>™</sup> IgM αντισώματα κατά του Asialo GM <sub>1</sub>	1181M
Immulin <sup>™</sup> IgG αντισώματα κατά του Asialo GM <sub>1</sub>	1181G
Immulin <sup>™</sup> IgM αντισώματα κατά του GD <sub>1b</sub>	1183M
Immulin <sup>™</sup> IgG αντισώματα κατά του GD <sub>1b</sub>	1183G
Immulin <sup>™</sup> IgM αντισώματα κατά του GQ <sub>1b</sub>	1184M
Immulin <sup>™</sup> IgG αντισώματα κατά του GQ <sub>1b</sub>	1184G
Immulin <sup>™</sup> IgM αντισώματα κατά του γαλακτοσερεβροσιδίου	1185M
Immulin <sup>™</sup> IgG αντισώματα κατά του γαλακτοσερεβροσιδίου	1185G
Immulin <sup>™</sup> IgM αντισώματα κατά του GD <sub>1a</sub>	1186M
Immulin <sup>™</sup> IgG αντισώματα κατά του GD <sub>1a</sub>	1186G

Τα κιτ περιέχουν επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> †	<b>Πλακίδιο</b> ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με κεκαθαρμένο αντιγόνο. Το αντιγόνο γαγγλιοσιδίου αναγράφεται στην ετικέτα.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> * †	Έτοιμος προς χρήση <b>βαθμονομητής</b> (πράσινο πώμα). Προερχόμενος από ορό ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά των αντίστοιχων γαγγλιοσιδίων. Η συγκέντρωση, σε EU/ml, αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b> + * †	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για το αντίστοιχο αντίσωμα γαγγλιοσιδίου.

EL

1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b> - *	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα αρνητικού ελέγχου</b> (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου αρνητικό για αντίσωμα γαγγλιοσιδίου.
1 x 12 ml	<b>CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> * †	Έτοιμο προς χρήση <b>αντίσωμα κατά της ανθρώπινης IgM ή IgG συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση</b> . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>αραιωτικό διάλυμα ορού</b> . Χρώματος μπλε.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>ενζυμικό υπόστρωμα</b> . Περιέχει ρ-νιτροφαινυλική φωσφατάση (ρNPP). <b>Να προστατεύεται από το φως</b> .
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα τερματισμού</b> .
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	Σκόνη <b>ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης</b> . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

\* Περιέχει <0,1% NaN<sub>3</sub>

† Αναφέρονται παρακάτω τα συγκεκριμένα αντιγόνα και αντισώματα/ισότυποι των πλακιδίων κάθε kit αυτής της σειράς προϊόντων:







- REF** Το 1180M περιλαμβάνει πλακίδιο για την GM<sub>1</sub>, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgM κατά της GM<sub>1</sub> και συζευκτικό αντίσωμα IgM,
- REF** Το 1180G περιλαμβάνει πλακίδιο για την GM<sub>1</sub>, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgG κατά της GM<sub>1</sub> και συζευκτικό αντίσωμα IgG,
- REF** Το 1181M περιλαμβάνει πλακίδιο για την Asialo GM<sub>1</sub>, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgM κατά της Asialo GM<sub>1</sub> και συζευκτικό αντίσωμα IgM,
- REF** Το 1181G περιλαμβάνει πλακίδιο για την Asialo GM<sub>1</sub>, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgG κατά της Asialo GM<sub>1</sub> και συζευκτικό αντίσωμα IgG,
- REF** Το 1183M περιλαμβάνει πλακίδιο για την GD<sub>1b</sub>, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgM κατά της GD<sub>1b</sub> και συζευκτικό αντίσωμα IgM,
- REF** Το 1183G περιλαμβάνει πλακίδιο για την GD<sub>1b</sub>, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgG κατά της GD<sub>1b</sub> και συζευκτικό αντίσωμα IgG,
- REF** Το 1184M περιλαμβάνει πλακίδιο για την GQ<sub>1b</sub>, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgM κατά της GQ<sub>1b</sub> και συζευκτικό αντίσωμα IgM,
- REF** Το 1184G περιλαμβάνει πλακίδιο για την GQ<sub>1b</sub>, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgG κατά της GQ<sub>1b</sub> και συζευκτικό αντίσωμα IgG,
- REF** Το 1185M περιλαμβάνει πλακίδιο για το γαλακτοσερεβροσίδιο, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgM κατά του γαλακτοσερεβροσιδίου και συζευκτικό αντίσωμα IgM,
- REF** Το 1185G περιλαμβάνει πλακίδιο για το γαλακτοσερεβροσίδιο, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgG κατά του γαλακτοσερεβροσιδίου και συζευκτικό αντίσωμα IgG,
- REF** Το 1186M περιλαμβάνει πλακίδιο για την GD<sub>1a</sub>, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgM κατά της GD<sub>1a</sub> και συζευκτικό αντίσωμα IgM,
- REF** Το 1186G περιλαμβάνει πλακίδιο για την GD<sub>1a</sub>, βαθμονομητή και διάλυμα έλεγχου αντισώματος IgG κατά της GD<sub>1a</sub> και συζευκτικό αντίσωμα IgG,

#### Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

**LOT** Αριθμός παρτίδας

**REF** Αριθμός καταλόγου

EL

-  Ημερομηνία λήξης
-  Θερμοκρασία αποθήκευσης
-  Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης
-  In vitro διαγνωστική χρήση
-  Κατασκευαστής
-  Αριθμός αναλύσεων

#### **Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται**

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα
- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικά χαρτιά
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

#### **ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψυχθούν στους -20°C. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

#### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

##### **Σημειώσεις της διαδικασίας**

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος προτού ξεκινήσετε την ανάλυση.
- Αφαιρέστε τις απαιτούμενες ταινίες μικροκυπελίδων από τη θήκη και επιστρέψτε αμέσως τυχόν μη χρησιμοποιημένες μικροκυπελίδες στο ψυγείο μέσα σε σφραγισμένη θήκη, προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν συμπίκνωση υδρατμών.
- **Αφήστε το ενζυμικό υπόστρωμα να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Όλα τα άλλα αντιδραστήρια, συμπεριλαμβανομένου του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, πρέπει να παραμένουν σε θερμοκρασία 2-8°C και να χρησιμοποιούνται κρύα.** Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Αραιώστε τα δείγματα των ασθενών αμέσως προτού ξεκινήσετε την ανάλυση και φυλάξτε τις αραιώσεις σε θερμοκρασία 2-8°C μέχρι τη χρήση τους.
- Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και αφήστε το να φτάσει σε θερμοκρασία 2-8°C. Η προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης δεν μπορεί να γίνει αμέσως πριν από την εκτέλεση της ανάλυσης.
- **Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης και συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.** Εάν η έκπλυση δεν εκτελείται αυτόματα, επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας

EL

μια ισχυρή ριπή **κρύου** ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από μια φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο κατά μήκος όλων των μικροκυψελίδων. Ωστόσο, η μη αυτόματη έκπλυση δε συνιστάται για αυτή την ανάλυση.

- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 ταινίες κυψελίδων. Με τον τρόπο αυτό, επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνονται πιο ομοιόμορφοι χρόνοι επώασης.
- Σε όλα τα βήματα είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των χρόνων. Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια σειρά και η έναρξη του χρόνου όλων των επώασεων θα πρέπει να ξεκινά με την ολοκλήρωση της προσθήκης των αντιδραστηρίων. Κάθε περίοδος επώασης πρέπει να χρονομετρείται ανεξάρτητα από την προηγούμενη.

### Μέθοδος ανάλυσης

**Βήμα 1** Διατηρήστε σε θερμοκρασία 2-8°C όλα τα αντιδραστήρια (εκτός από το ενζυμικό υπόστρωμα) και τις ταινίες του πλακιδίου μικροπιλοδότησης έως το βήμα 11 της ανάλυσης.

**Βήμα 2** Σημάνετε το φύλλο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στις μικροκυψελίδες σύμφωνα με την παρακάτω εικόνα. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.

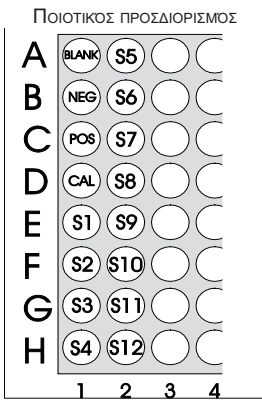
**Βήμα 3** Προετοιμάστε μια αραιώση των δειγμάτων ορού των ασθενών σε αναλογία **1:101**, αναμιγνύοντας **5 μl** των δειγμάτων ορού με **500 μl κρύου** αραιωτικού διαλύματος ορού.

**Βήμα 4** Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από την **κρύα** θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες στη σφραγισμένη θήκη στο ψυγείο. Τοποθετήστε σταθερά τις ταινίες μικροκυψελίδων στο επιπλέον πλαίσιο στήριξης.

**Σημείωση:** Κατά τη διάρκεια των βημάτων 1 έως και 5, διατηρήστε το πλακίδιο στον πάγο ώστε να διατηρείται σε θερμοκρασία 2-8°C.

**Σημείωση:** Προσθέστε **100 μl κρύου** αραιωτικού διαλύματος ορού σε μία μικροκυψελίδα ως τυφλό αντιδραστήριο. Όλα τα βήματα θα πρέπει να εκτελεστούν γρήγορα, προκειμένου να διατηρηθούν κρύες οι μικροκυψελίδες και οι αραιώσεις του ορού.

**Βήμα 5** Προσθέστε **100 μl** έτοιμου προς χρήση **κρύου** βαθμονομητή, θετικού και αρνητικού διαλύματος ελέγχου στις μικροκυψελίδες. Προσθέστε **100 μl κρύων** αραιωμένων δειγμάτων.



**Βήμα 6** Επώαστε επί 16-18 ώρες (μία νύχτα) σε θερμοκρασία 2-8°C.

**Βήμα 7** Εκπλύνετε **4 φορές** με **κρύο** ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε κυψελίδας. Αναστρέψτε το πλακίδιο και κτυπήστε το ελαφρά επάνω σε απορροφητικά χαρτιά. Κρατήστε το ανεστραμμένο επί -1 λεπτό ώστε να αποστραγγίσει όλο το υγρό από τις μικροκυψελίδες.  
**Σημείωση:** Μην το κτυπάτε δυνατά, κτυπήστε το ελαφρά ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια υγρού από τις κυψελίδες. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας όλες οι ταινίες πρέπει να διατηρούνται κρύες.

**Βήμα 8** Προσθέστε **100 μl κρύου** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.

EL

- Βήμα 9** Επωάστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Βήμα 10** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 7.
- Βήμα 11** Προσθέστε **100 μl ενζυμικού υποστρώματος που έχει φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου** σε κάθε κυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 12** Επωάστε επί **30 λεπτά** ( $\pm$  5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 13** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός μίας ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 14** Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου. Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 405/630 nm.

#### Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιείται τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της εξέτασης. Η μέτρηση απορρόφησης (OD) του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι  $<0,3$ . Η συγκέντρωση σε EU/ml του διαλύματος θετικού ελέγχου πρέπει να βρίσκεται εντός του εύρους που αναγράφεται στην ετικέτα. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να έχει συγκέντρωση  $<20$  EU/ml. Η απορρόφηση του βαθμονομητή θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για μεγαλύτερη επαναληψιμότητα, τα δείγματα μπορούν να αναλυθούν εις διπλούν και η συγκέντρωση σε EU/ml να υπολογιστεί με χρήση της μέση τιμής των μετρήσεων απορρόφησης των κυψελίδων που αναλύθηκαν εις διπλούν.

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

##### Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

##### 1. Ποιοτική

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με αυτή τη μέθοδο θα πρέπει να αναφέρονται ως θετικά ή ως αρνητικά.

##### Απορ/ση εξεταζόμενου δείγματος

----- X EU/ml του βαθμονομητή = EU/ml εξεταζόμενου δείγματος

##### Απορ/ση του βαθμονομητή

##### Ερμηνεία

Τα παρακάτω παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές. Οι τιμές αυτές ενδέχεται να ποικίλλουν σε κάθε πληθυσμό που εξετάζεται.

Τιμή αντισωμάτων κατά των γαγγλιοσιδίων	Ερμηνεία
$< 20$ EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (οριακό)
$>25$ EU/ml	Θετικό

##### 2. Ποσοτική

Οι ποσοτικές τιμές μπορούν να προσδιοριστούν για θετικά δείγματα εξέτασης χρησιμοποιώντας την ποσοτική μέθοδο. Οι ποσοτικές τιμές για τα θετικά δείγματα πρέπει να εκφράζονται σε τίτλο δείγματος<sup>14</sup>. Για τον προσδιορισμό

EL

του τίτλου των θετικών ασθενών εκτελέστε τέσσερις διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος του ασθενούς ξεκινώντας από αναλογία 1:101, και εκτελέστε την ανάλυση όπως υποδεικνύεται στην ενότητα Μέθοδος ανάλυσης. Η τελευταία αραιώση που παρουσιάζει συγκέντρωση σε EU/ml μεγαλύτερη από 25 αποτελεί τον τίτλο τελικού σημείου του ασθενούς. Παρακάτω παρατίθεται ένας πίνακας που υποδεικνύει την κατάλληλη προετοιμασία της σειράς των τεσσάρων διαδοχικών αραιώσεων.

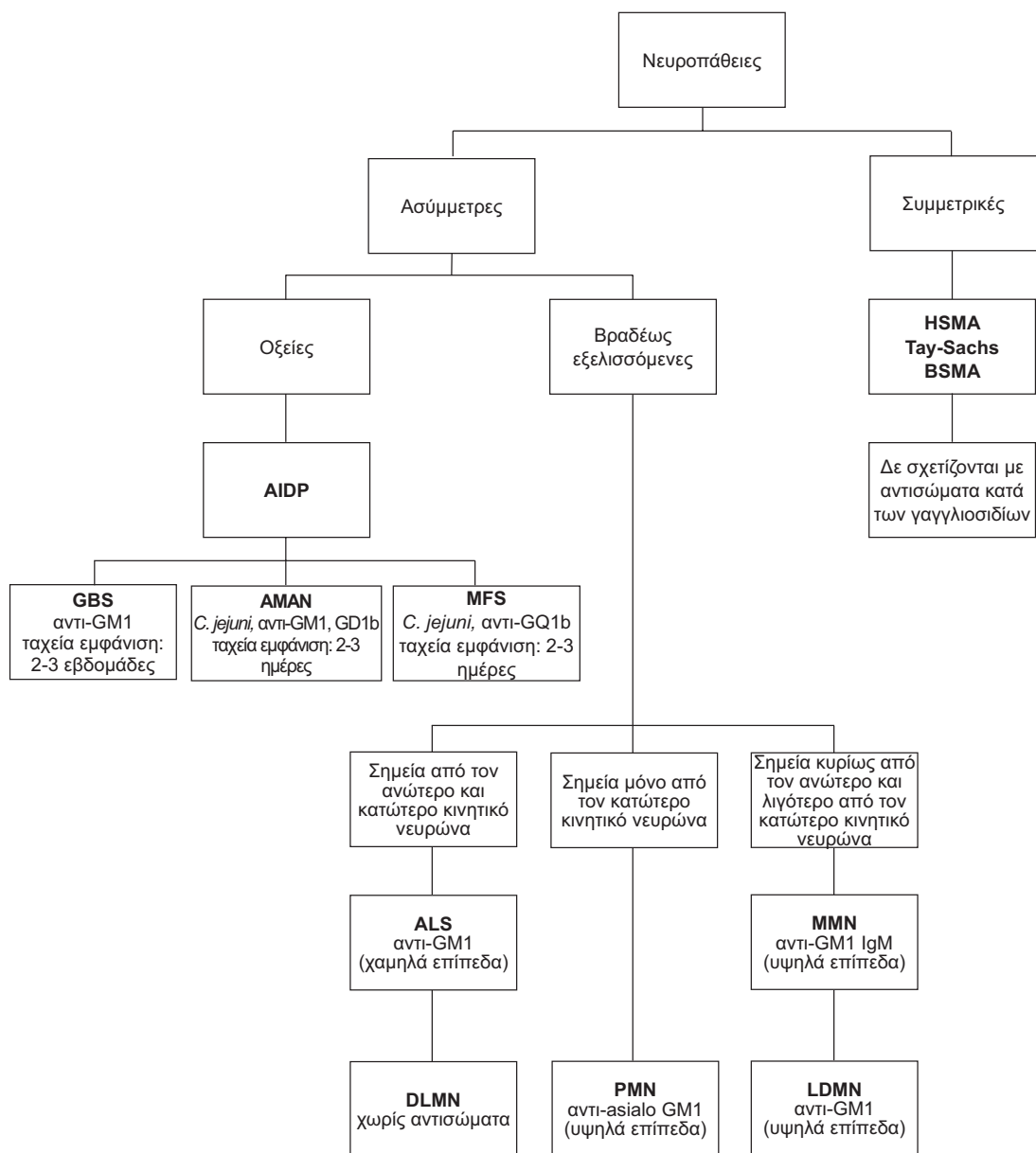
<b>Σωληνάρια</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Ορός</b>	10 μl			
	+			
<b>Αραιωτικό διάλυμα ορού</b>	1000 μl	800 μl	800 μl	800 μl
	↗	↗	↗	
<b>Μεταφορά</b>	200 μl	200 μl	200 μl	
<b>Τελική αραιώση</b>	1:100	~1:400	~1:1600	~1:6400

### ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή την ανάλυση δεν είναι διαγνωστικά από μόνα τους και θα πρέπει να ληφθούν υπόψη σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα του ασθενούς. Οποιαδήποτε ανάλυση με οριακή αντιδραστικότητα θα πρέπει να επαναληφθεί προκειμένου να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα. Συνιστάται επίσης οι ασθενείς με οριακά αποτελέσματα να επανεξετάζονται μετά από επόμενη αιμοληψία. Δε θα πρέπει να πραγματοποιείται ανοσοκατασταλτική θεραπεία, αφαίρεση πλάσματος, έναρξη ή αλλαγή στη θεραπεία ασθενούς με νευροπάθεια με βάση τυχόν θετική αντίδραση σε αυτή την ανάλυση. Όλες οι κλινικές παρατηρήσεις και, το σημαντικότερο, τα ηλεκτροφυσιολογικά δεδομένα όπως είναι ο αποκλεισμός της αγωγής των κινητικών ώσεων ή άλλα σχετικά συμπτώματα θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της ανάλυσης γαγγλιοσιδίων. Ο ορός ορισμένων ασθενών με κινητικές νευροπάθειες ενδέχεται να είναι αρνητικός για συγκεκριμένα γαγγλιοσίδια. Οι ασθενείς αυτοί θα πρέπει να ελεγχθούν για αυτοαντισώματα κατά άλλων γαγγλιοσιδίων.

### ANAMENOMENES TIMEΣ

Το παρακάτω διάγραμμα ροής απεικονίζει την παρουσία αντισωμάτων κατά των γαγγλιοσιδίων σε συγκεκριμένες, καλά χαρακτηρισμένες νευροπάθειες<sup>1,7</sup>. Το διάγραμμα αυτό προορίζεται μόνο για την υποβοήθηση της διαφορικής διάγνωσης και δε θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως οριστική πληροφόρηση για όλες τις νευροπάθειες που παρατίθενται. Βλ. τους περιορισμούς της διαδικασίας.



### Υπόμνημα

- GBS = Σύνδρομο Guillain-Barré  
 AMAN = Οξεία αξονική κινητική νευροπάθεια  
 MFS = Σύνδρομο Miller-Fisher  
 ALS = Αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση  
 MMN = Πολυεστιακή κινητική νευροπάθεια  
 HSMA = Κληρονομική σπονδυλική μυϊκή ατροφία  
 LDMN = Σύνδρομο κατώτερου περιφερικού κινητικού νευρώνα  
 PMN = Σύνδρομο εγγύς κινητικού νευρώνα  
 DLMN = Διάχυτο σύνδρομο κατώτερου κινητικού νευρώνα  
 AIDP = Οξεία φλεγμονώδης απομυελινωτική πολυνευροπάθεια



## Ensayo ELISA para anticuerpos anti gangliósidos

IVD

### PROSPECTO

<b>REF</b>	1180M anti-GM <sub>1</sub> IgM 96 análisis
<b>REF</b>	1180G anti-GM <sub>1</sub> IgG 96 análisis
<b>REF</b>	1181M anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgM 96 análisis
<b>REF</b>	1181G anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgG 96 análisis
<b>REF</b>	1183M anti-GD <sub>1b</sub> IgM 96 análisis
<b>REF</b>	1183G anti-GD <sub>1b</sub> IgG 96 análisis
<b>REF</b>	1184M anti-GQ <sub>1b</sub> IgM 96 análisis
<b>REF</b>	1184G anti-GQ <sub>1b</sub> IgG 96 análisis
<b>REF</b>	1185M anti-Galactocerebrósido IgM 96 análisis
<b>REF</b>	1185G anti-Galactocerebrósido IgG 96 análisis
<b>REF</b>	1186M anti-GD <sub>1a</sub> IgM 96 análisis
<b>REF</b>	1186G anti-GD <sub>1a</sub> IgG 96 análisis

### USO PREVISTO

Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para la detección semi cuantitativa de anticuerpos anti gangliósidos en suero humano; se utilizan como complemento de las indicaciones clínicas en pacientes con trastornos de las neuronas motoras o neuropatías.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los gangliósidos son esfingolípidos glicosilados ácidos que se localizan en la parte externa de las membranas plasmáticas; están presentes en una variedad de trastornos de las neuronas motoras y de neuropatías. En general, las neuropatías son debilitantes y pueden ser fatales si afectan órganos vitales. Las neuropatías pueden ser resultado de condiciones hereditarias o bien ser consecuencia de una infección o una enfermedad autoinmune. Con frecuencia, diferentes neuropatías se presentan con síntomas similares y por tanto resultan difíciles de diagnosticar. Es importante llegar a formular un diagnóstico preciso porque tanto el tratamiento adecuado como el pronóstico de la enfermedad varían según el tipo de neuropatía<sup>1</sup>.

Algunas neuropatías, en especial el síndrome de Guillain-Barré (SGB), están mejor caracterizadas que otras. El SGB es una patología autoinmune caracterizada por debilidad muscular progresiva, pérdida de reflejos tendinosos y disfunciones sensoriales. El SGB es una neuropatía inflamatoria aguda. Los pacientes que padecen de SGB presentan anticuerpos anti gangliósidos GM<sub>1</sub><sup>2,3</sup>. Estos anticuerpos se encuentran en pacientes con graves lesiones axonales; están dirigidos contra la estructura de galactosa-galactosamina de la fracción de carbohidratos de la molécula<sup>4</sup>. El SGB es un trastorno autoinmune típico del período postinfeccioso. Más de los dos tercios de pacientes con SGB tienen antecedentes de infecciones, por lo general por virus o bacterias. El *Cytomegalovirus*, asociado a infecciones de las vías respiratorias superiores, y el *Campylobacter jejunii*, asociado a la gastroenteritis, dan inicio a una respuesta autoinmune de reactividad cruzada contra los gangliósidos, cuyo resultado es la deposición de complejos inmunes y pérdida de mielina de los nervios, que provocan lentitud e incluso bloqueo de la conducción nerviosa<sup>5</sup>.

Los gangliósidos GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> y asialo GM<sub>1</sub> comparten el mismo terminal Gal (β1-3) residuos de GalNAc. Se ha comprobado que en varios tipos de neuropatías motoras coexisten anticuerpos IgM de títulos elevados contra GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> y asialo GM<sub>1</sub><sup>6</sup>. Entre éstos, los anticuerpos anti-GM<sub>1</sub> se asocian principalmente con neuropatías motoras multifocales y no se observan nunca en enfermedades de las neuronas motoras inferiores<sup>7</sup>. Este aspecto los distingue de los anticuerpos anti-GD<sub>1b</sub> y anti-Asialo GM<sub>1</sub>, presentes sobre todo en los casos de neuropatías motoras inferiores.

Se han reportado perfiles serológicos para anticuerpos antigangliósidos en pacientes con SGB, tanto sometidos a tratamiento como sin tratamiento<sup>8</sup>. El título más alto de anti-GM<sub>1</sub> IgG y anti-GD<sub>1a</sub> IgM se registró alrededor de los cuarenta (40) y noventa (90) días respectivamente después del tratamiento. Los títulos de anti-GM<sub>1</sub> IgG disminuyeron después de un tratamiento con inmunoglobulina por vía endovenosa (IVIg). La utilidad clínica de estos anticuerpos está demostrada por la correlación entre la mayor concentración de anticuerpos, mayor

incapacidad y peores resultados clínicos<sup>8</sup>. El 23% de pacientes con esclerosis múltiple (SM) y el 18% con neuritis óptica (NO) presenta anticuerpos anti-GD<sub>1a</sub> IgG<sup>9</sup>. El aumento de la respuesta GD<sub>1a</sub> IgG puede utilizarse como factor discriminante entre SM y SGB<sup>9</sup>. Estudios inmunopatológicos sugieren que el blanco del ataque inmune es diferente en los varios subtipos de SGB. En la neuropatía motora axonal aguda, el ataque está dirigido contra el axolema y contra los nudos de Ranvier. Los anticuerpos anti GD<sub>1a</sub> se unen selectivamente a los nudos de los nervios motores y no a los nudos de Ranvier de los nervios sensores, hecho que sugiere su papel patogénico<sup>10</sup>.

Según se ha reportado, los anticuerpos anti-GM<sub>1</sub> y anti-GD<sub>1b</sub> también pueden estar presentes en pacientes con esclerosis múltiple (SM), lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de Alzheimer y también en algunos individuos normales. Es importante destacar que los anticuerpos anti-GM<sub>1</sub> y otros anticuerpos relacionados con título superior a 1.800 están estrechamente y específicamente asociados con enfermedades de las neuronas motoras inferiores, neuropatías sensomotoras y neuropatías motoras<sup>11</sup>.

En pacientes que padecen otras neuropatías, las respuestas autoinmunes pueden estar dirigidas contra GQ<sub>1b</sub> y gangliósidos sulfatadas<sup>7</sup>. Los anticuerpos GQ<sub>1b</sub> se asocian al síndrome de Miller Fisher, rara variante del SGB que provoca oftalmoplegia, ataxia y arreflexia, y que frecuentemente es posterior a un episodio infeccioso. Los anticuerpos antigalactocerebrósido se presentan estrechamente relacionados con los anticuerpos antisulfatidas; se han observado en pacientes con neuritis leprosa, tripanosomiasis africana y leishmaniasis mucocutánea.

Los anticuerpos de importancia clínica pertenecen por lo general a los isotipos IgM o IgG. Se ha demostrado que el intercambio de plasma es una medida terapéutica eficaz, siempre que se efectúe antes de las dos semanas después del surgimiento de los síntomas<sup>12</sup>. Por consiguiente, los análisis de laboratorio tendientes a la detección temprana de anticuerpos contra los diferentes gangliósidos pueden complementar efectivamente esas terapias.

## PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los análisis de anticuerpos anti gangliósidos ImmuLISA™ son inmunoensayos de fase sólida (ELISA). En micropocillos recubiertos de antígeno purificado se incuban controles, calibradores y muestras de suero del paciente, permitiendo que los anticuerpos específicos presentes en el suero se unan al antígeno respectivo. Los anticuerpos que no se han unido y demás proteínas del suero se eliminan mediante lavado. A continuación se añade un conjugado anti humano marcado con enzima; todo el conjugado no unido se elimina mediante lavado. Luego se añade a los pocillos un sustrato enzimático (pNPP) que provoca un cambio de color debido a la conversión del sustrato en un producto de reacción amarillo. Se detiene la reacción y con un espectrofotómetro a 405 nm se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración del anticuerpo; esta última se expresa en unidades ELISA Units por mililitro (EU/ml) en el calibrador y el control positivo. Estos valores se utilizan para verificar la conformidad con los análisis de control de calidad y para determinar los resultados cualitativos. Las muestras positivas deben expresarse con título.

## REACTIVOS

### Conservación y preparación

**Conserve los reactivos a 2-8°C. No los congele.** No utilice los reactivos si se presentan turbios o se advierten precipitados **Todos los reactivos deben mantenerse a 2-8°C durante el uso**, con excepción el sustrato enzimático que se ha de estabilizar a temperatura (20-25°C) antes de usarlo. Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

### Precauciones

Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales<sup>13</sup>.

**ADVERTENCIA:** la azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

**Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto.** No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

### Material suministrado

<b>Producto</b>	<b>REF</b>
anti-GM <sub>1</sub> IgM	1180M
anti-GM <sub>1</sub> IgG	1180G
anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgM	1181M
anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgG	1181G
anti-GD <sub>1b</sub> IgM	1183M
anti-GD <sub>1b</sub> IgG	1183G
anti-GQ <sub>1b</sub> IgM	1184M
anti-GQ <sub>1b</sub> IgG	1184G
anti-Galactocerebroside IgM	1185M
anti-Galactocerebroside IgG	1185G
anti-GD <sub>1a</sub> IgM	1186M
anti-GD <sub>1a</sub> IgG	1186G

Los reactivos de cada kit son suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> †	<b>Microplaca con micropocillos individuales separables recubiertos</b> con antígeno purificado. El antígeno gangliósido está indicado en la etiqueta.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> * †	<b>Calibrador</b> listo para usar ( <i>tapa verde</i> ). Derivado de suero humano con anticuerpos contra el respectivo gangliósido. La concentración en EU/ml está impresa en la etiqueta del frasco.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL +</b> * †	<b>Control positivo</b> listo para usar ( <i>tapa roja</i> ). Contiene suero humano positivo al anticuerpo del respectivo gangliósido.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Control negativo</b> listo para usar ( <i>tapa blanca</i> ). Contiene suero humano negativo a anticuerpos anti gangliósidos.
1 x 12 ml	<b>CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> * †	<b>Conjugado anti humano IgM o IgG con fosfatasa alcalina listo para usar.</b> Color rosado.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente de suero listo para usar.</b> Color azul.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato enzimático</b> listo para usar. Contiene pNPP. <b>Protéjase de la luz.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solución Stop</b> lista para usar.
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Tampón de lavado</b> en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.

\* Contiene <0.1% NaN<sub>3</sub>






† El antígeno y el anticuerpo/isotipo de la microplaca específicos de cada kit en esta familia de productos se indican a continuación:

**REF** 1180M contiene microplaca para GM<sub>1</sub>, calibrador y control para GM<sub>1</sub> IgM y conjugado IgM

ES

- REF** 1180G contiene microplaca para GM<sub>1</sub>, calibrador y control para GM<sub>1</sub> IgG y conjugado IgG
- REF** 1181M contiene microplaca para Asialo GM<sub>1</sub>, calibrador y control para Asialo GM<sub>1</sub> IgM y conjugado IgM
- REF** 1181G contiene microplaca para Asialo GM<sub>1</sub>, calibrador y control para Asialo GM<sub>1</sub> IgG y conjugado IgG
- REF** 1183M contiene microplaca para GD<sub>1b</sub>, calibrador y control para GD<sub>1b</sub> IgM y conjugado IgM
- REF** 1183G contiene microplaca para GD<sub>1b</sub>, calibrador y control para GD<sub>1b</sub> IgG y conjugado IgG
- REF** 1184M contiene microplaca para GQ<sub>1b</sub>, calibrador y control para GQ<sub>1b</sub> IgM y conjugado IgM
- REF** 1184G contiene microplaca para GQ<sub>1b</sub>, calibrador y control para GQ<sub>1b</sub> IgG y conjugado IgG
- REF** 1185M contiene microplaca para galactocerebrósido, calibrador y control para galactocerebrósido IgM y conjugado IgM
- REF** 1185G contiene microplaca para galactocerebrósido, calibrador y control para galactocerebrósido IgG y conjugado IgG
- REF** 1186M contiene microplaca para GD<sub>1a</sub>, calibrador y control para GD<sub>1a</sub> IgM y conjugado IgM
- REF** 1186G contiene microplaca para GD<sub>1a</sub>, calibrador y control para GD<sub>1a</sub> IgG y conjugado IgG

#### Símbolos utilizados en las etiquetas:

- LOT** Número de lote
- REF** Número de catálogo
-  Fecha de caducidad
-  Temperatura de conservación
-  Léanse las instrucciones de uso
- IVD** Para diagnóstico *in vitro*
-  Fabricante
-  Número de análisis

#### Materiales necesarios no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido
- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a **405 nm**. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Lavador automático de microplacas con capacidad de 200 µl

#### RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°c no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

**PROCEDIMIENTO**

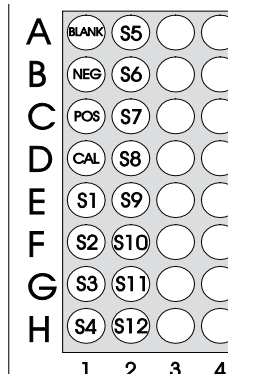
**Advertencias preliminares**

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.
- **Deje que el substrato enzimático se estabilice a temperatura ambiente antes de usarlo. Los demás reactivos, incluido el tampón de lavado, deben mantenerse a 2-8°C y se usan fríos.** Vuelva a poner de inmediato en la nevera los materiales y muestras no utilizados
- Diluya las muestras del paciente inmediatamente antes de empezar el análisis; conserve las diluciones a 2-8°C hasta el momento de usarlas.
- Prepare el tampón de lavado y estabilice su temperatura a 2-8°C. El tampón de lavado no puede prepararse momentos antes de empezar el análisis.
- **Una buena técnica de lavado es crucial; se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.** Si efectúa el lavado manualmente, rocíe toda la microplaca con un fuerte chorro de solución de lavado **fría**, utilizando una botella de boca ancha. Para este análisis no es recomendable el lavado manual.
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo en cada paso. Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia; El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos. Controle el tiempo de cada período de incubación independientemente del precedente.

**Procedimiento del ensayo**

- Paso 1** Mantenga los reactivos (con excepción del substrato enzimático) y las tiras de microtitulación a temperatura de 2 a 8°C hasta el paso 11 del análisis.
- Paso 2** Señale en la hoja de protocolo la posición de la muestra en los pocillos, según el esquema de muestras que figura más abajo. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.
- Paso 3** Prepare una dilución de **1:101** de muestras de suero del paciente mezclando **5 µl** de muestras de suero con **500 µl** de diluyente de suero **frío**.
- Paso 4** Coja los pocillos necesarios del sobre **frío**; guarde las tiras no utilizadas en el sobre hermético y póngalo en la nevera. Coloque los pocillos en el soporte suplementario.  
**Nota:** durante los pasos de 1 a 5, coloque la microplaca sobre hielo para mantener la temperatura de 2-8°C.  
**Nota:** Pipetee **100 µl** de diluyente de suero **frío en un pocillo como blanco de reactivo**. Es necesario proceder con rapidez para evitar que los pocillos y las diluciones de suero se calienten.
- Paso 5** Pipetee en los pocillos **100 µl** de calibrador listo para usar, controles positivo y negativo, **todos fríos**. Pipetee **100 µl** de muestras diluidas **frías**.

DETERMINACIÓN CUALITATIVA



ES

- Paso 6** Incube 16-18 horas (de un día para otro) a 2-8°C.
- Paso 7** Lave **4 veces** con el tampón de lavado **frío**. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Aspire el contenido de cada pocillo. Invierta la microplaca y golpéela suavemente sobre papel absorbente. Manténgala boca abajo durante  $\square$ 1 minuto para drenar todo el líquido. **Advertencia: no golpee con fuerza, golpee suavemente para quitar el exceso de líquido de los pocillos. Mantenga frías todas las tiras durante esta operación.**
- Paso 8** Pipetee **100  $\mu$ l** de conjugado **frío** en los pocillos.
- Paso 9** Incube 2 horas a 2-8°C.
- Paso 10** Lave los pocillos como en el paso 7.
- Paso 11** Pipetee en cada pocillo **100  $\mu$ l** de **substrato enzimático estabilizado a temperatura ambiente**, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.
- Paso 12** Incube **30 minutos** ( $\pm$  5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 13** Pipetee **100  $\mu$ l** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el substrato enzimático. Lea los valores de absorbancia en el plazo de una hora después de añadir la solución Stop.
- Paso 14** Ponga en cero el lector ELISA contra el blanco de reactivo. Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630 nm.

#### Control de calidad

En cada ensayo debe procesarse un blanco de reactivo para verificar la integridad y precisión del análisis. La densidad óptica de lectura del blanco de reactivo debe ser  $<0.3$ . Las EU/ml del control positivo deben estar dentro de los valores indicados en la etiqueta. El control negativo debe ser  $< 20$  EU/ml. La DO del calibrador debe ser superior a la del control negativo e inferior a la del control positivo. Para Control. Para mejorar la reproducibilidad, las muestras se pueden analizar por duplicado; para calcular las EU/ml se tomará la media de las lecturas de DO de los pocillos duplicados.

#### RESULTADOS

##### Cálculo

Las concentraciones en las muestras del paciente se pueden determinar por uno de los siguientes métodos:

##### 1. Cualitativo

Los resultados obtenidos con este método se reportarán como positivos o negativos.

##### Abs. de muestra analizada

----- X EU/ml del calibrador = EU/ml muestra analizada

##### Abs. del calibrador

##### Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales, que podrán variar según la población examinada.

Valor anti gangliósidos	Interpretación
$< 20$ EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Incierto (valores límite)
$>25$ EU/ml	Positivo

##### 2. Cuantitativo

Los valores cuantitativos se pueden determinar en muestras que resultaron positivas con el método cualitativo. Los valores cuantitativos de las muestras positivas se han de expresar en título de la muestra.<sup>14</sup> Para determinar

ES

el título de pacientes positivos, efectúe cuatro diluciones seriadas de la muestra del paciente a partir de 1:101 y analícelas siguiendo el método del ensayo. La última dilución con valor de EU/ml superior a 25 es el punto de titulación del paciente. En la siguiente tabla se indica cómo preparar correctamente las cuatro diluciones seriadas.

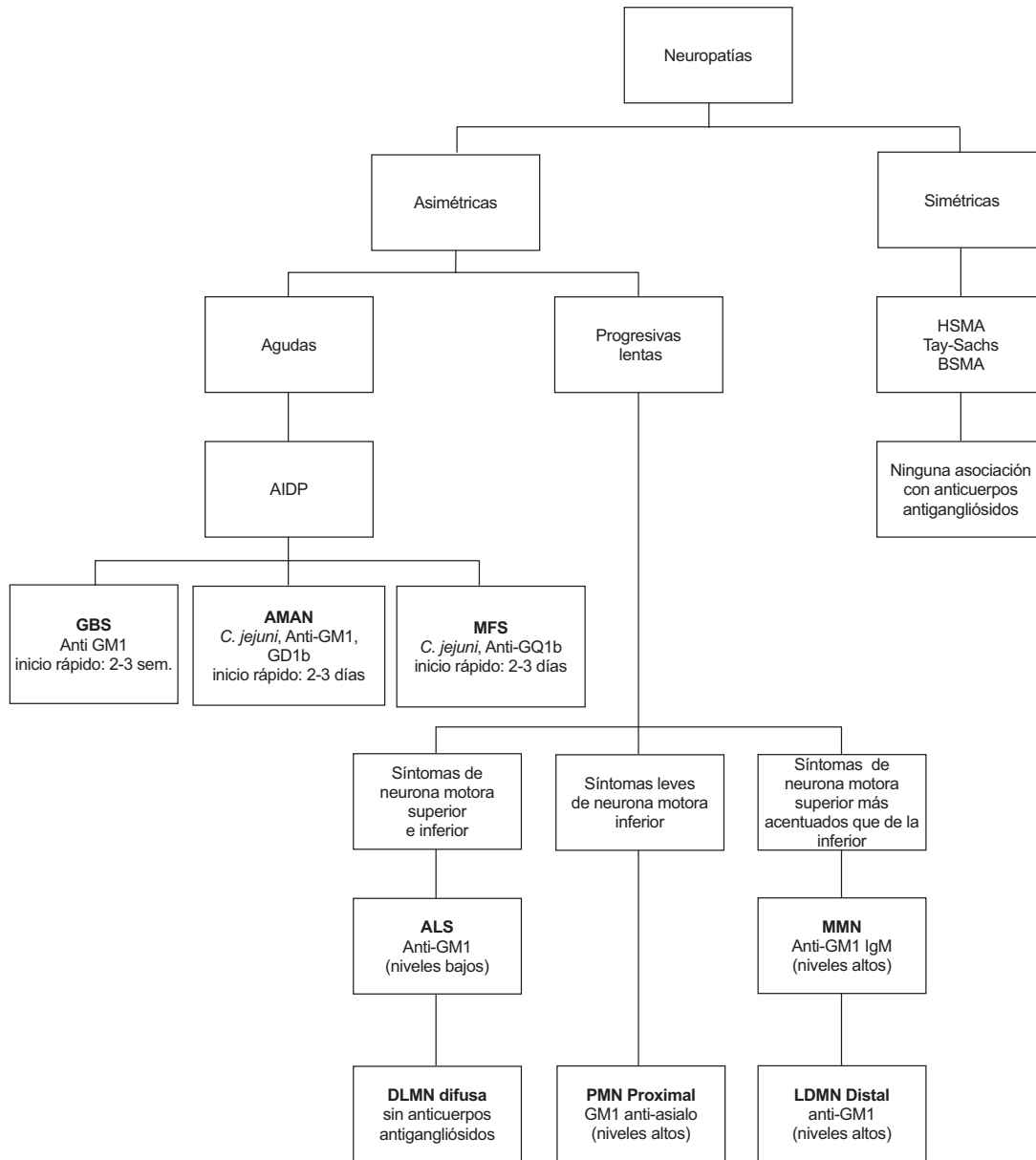
<b>Tubos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Suero</b>	10 µl			
	+			
<b>Diluyente tamponado</b>	1000 µl	800 µl	800 µl	800 µl
		↻	↻	↻
<b>Transferir</b>	200 µl	200 µl	200 µl	
<b>Dilución final</b>	1:100	~1:400	~1:1600	~1:6400

### **LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

Los resultados obtenidos con este análisis no deben interpretarse como un diagnóstico por sí solos, sino que deben evaluarse junto con el examen clínico del paciente. Los resultados inciertos (borderline) se han de analizar otra vez para confirmar el resultado. Es aconsejable que pacientes con estas características repitan el análisis a intervalos adecuados. La terapia inmunosupresora o la plasmaféresis, como así el comienzo o la modificación del tratamiento de un paciente con neuropatía no debe basarse en la reacción positiva a este ensayo, sino que se han de tener en cuenta todas las observaciones clínicas y, mas aún, los datos electrofisiológicos tales como bloqueo de la conducción nerviosa u otros síntomas relacionados, junto con los resultados del análisis de gangliósidos. El suero de algunos pacientes con neuropatías motoras podría ser negativo a determinados gangliósidos. En pacientes con estas características deben efectuarse análisis en busca de autoanticuerpos contra otros gangliósidos.

### **VALORES ESPERADOS**

En el siguiente gráfico se ilustra la presencia de anticuerpos antigangliósidos en determinadas neuropatías bien caracterizadas<sup>1,7</sup>. El gráfico es sólo una ayuda para el diagnóstico diferencial y no debe tomarse como información definitiva de todas las neuropatías enumeradas. Consulte las limitaciones del procedimiento.



**Leyenda**

- GBS = Síndrome de Guillain-Barré
- AMAN = Neuropatía motora axonal aguda
- MFS = Síndrome de Miller-Fisher
- ALS = Esclerosis laterla amiotrófica
- MMN = Neuropatía motora multifocal
- HSMA = Atrofia muscular espinal hereditaria
- LDMN = Síndrome de neurona motora distal inferior
- PMN = Síndrome de neurona motor proximal
- DLMN = Síndrome de neurona motora inferior difusa
- AIDP = Polineuropatía inflamatoria desmielinizante aguda



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

## Gangliosid-Antikörper-ELISA

IVD

### BEIPACKTEXT

<b>REF</b> 1180M	Anti-GM <sub>1</sub> IgM 96 Bestimmungen
<b>REF</b> 1180G	Anti-GM <sub>1</sub> IgG 96 Bestimmungen
<b>REF</b> 1181M	Anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgM 96 Bestimmungen
<b>REF</b> 1181G	Anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgG 96 Bestimmungen
<b>REF</b> 1183M	Anti-GD <sub>1b</sub> IgM 96 Bestimmungen
<b>REF</b> 1183G	Anti-GD <sub>1b</sub> IgG 96 Bestimmungen
<b>REF</b> 1184M	Anti-GQ <sub>1b</sub> IgM 96 Bestimmungen
<b>REF</b> 1184G	Anti-GQ <sub>1b</sub> IgG 96 Bestimmungen
<b>REF</b> 1185M	Anti-Galactocerebrosid IgM 96 Bestimmungen
<b>REF</b> 1185G	Anti-Galactocerebrosid IgG 96 Bestimmungen
<b>REF</b> 1186M	Anti-GD <sub>1a</sub> IgM 96 Bestimmungen
<b>REF</b> 1186G	Anti-GD <sub>1a</sub> IgG 96 Bestimmungen

### VERWENDUNGSZWECK

Diese enzymgekoppelten Immunabsorptionstests (ELISA) dienen dem semi-quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen Ganglioside in Humanserum als Zusatz zu klinischen Anzeichen bei Patienten mit Motoneuronerkrankungen / Neuropathien.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Ganglioside sind saure Glycosphingolipide, die in der äußeren Schicht von Plasmamembranen vorkommen und bei verschiedenen Motoneuronerkrankungen / Neuropathien auftreten. Neuropathien können allgemein schwächend sein und, wenn sie die Funktion lebenswichtiger Organe betreffen, manchmal tödlich verlaufen. Neuropathien können erblich sein oder auf eine Infektion oder eine Autoimmunerkrankung zurückgehen. Unterschiedliche Neuropathien treten häufig mit ähnlichen Symptomen auf und sind daher schwer zu diagnostizieren. Eine genaue Diagnose ist wichtig, da die angemessene Behandlungsart und die Prognose je nach der speziellen Neuropathie unterschiedlich sein können<sup>1</sup>.

Einige Neuropathien, insbesondere Guillain-Barré-Syndrom (GBS), sind besser charakterisiert als andere. GBS bezeichnet eine Autoimmunkrankheit, die durch schnell fortschreitende Schwäche der Gliedmaßen, Verlust der Sehnenreflexe und Empfindungsstörungen gekennzeichnet ist. GBS ist eine akute, entzündliche Neuropathie. Patienten mit GBS produzieren Antikörper gegen GM<sub>1</sub>-Ganglioside<sup>2,3</sup>. Über diese Antikörper wird bei Patienten mit schweren axonalen Schäden berichtet; sie richten sich gegen die Galaktose-Galaktosamin-Struktur des Kohlenhydratanteils von Molekülen<sup>4</sup>. GBS ist eine typische postinfektiöse Autoimmunerkrankung. Über zwei Drittel der GBS-Patienten litten zuvor an einer üblicherweise durch ein Virus oder Bakterium hervorgerufenen Infektion. Mit Infektionen der oberen Atemwege assoziierter *Cytomegalovirus* und mit Gastroenteritis assoziierte *Campylobacter jejuni* induzieren eine kreuzreaktive Immunreaktion auf Ganglioside, die eine Ablagerung von Immunkomplex und eine Demyelinisierung der Nerven zur Folge hat; dies führt zu verlangsamter Nervenleitung oder Blockierungen<sup>5</sup>.

GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> und Asialo-GM<sub>1</sub> haben dieselben terminalen Gal-(β1-3)-GalNAc-Reste. Es wurde gezeigt, dass erhöhte Titer von IgM-Antikörpern gegen GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> und Asialo-GM<sub>1</sub> bei mehreren Arten von motorischen Neuropathien nebeneinander bestehen. Von diesen wird das Vorliegen von Anti-GM<sub>1</sub> vorzugsweise mit multifokalen motorischen Neuropathien in Verbindung gebracht, während es nie bei Erkrankungen des zweiten Motoneurons beobachtet wird<sup>7</sup>. Diese Beobachtung unterscheidet sie von Anti-GD<sub>1b</sub>- und Anti-Asialo-GM<sub>1</sub>-Antikörpern, die vorzugsweise bei Fällen mit Neuropathien mit Beteiligung des zweiten Motoneurons beobachtet werden.

Es wurden serologische Profile für Anti-Gangliosid-Antikörper bei behandelten und nicht behandelten GBS-Patienten gemeldet<sup>8</sup>. Nach der Behandlung erreichten Anti-GM<sub>1</sub>-IgG-Titer und Anti-GD<sub>1a</sub>-IgM-Titer ihre Höchstwerte um den vierzigsten (40.) bzw. neunzigsten (90.) Tag herum. Anti-GM<sub>1</sub>-IgG-Titer fielen nach einer intravenösen Behandlung mit Immunglobulinen (IVIg) ab. Der klinische Nutzen dieser Antikörper wird durch die Korrelation der Antikörperhöchstwerte mit einer höheren Punktzahl auf der Beeinträchtigungsskala und mit einem schlechteren

DE

klinischen Ausgang demonstriert<sup>8</sup>. Anti-GD<sub>1a</sub>-IgG-Antikörper wurden auch bei 23% von Patienten mit multipler Sklerose (MS) und 18% von Patienten mit optischer Neuritis (ON) nachgewiesen<sup>9</sup>. Die erhöhten GD<sub>1a</sub>-IgG-Reaktionen können als Faktor zur Unterscheidung zwischen MS und GBS verwendet werden<sup>9</sup>. Immunpathologische Studien lassen darauf schließen, dass das Ziel des Immunangriffs bei den verschiedenen Untertypen von GBS unterschiedlich ist. Bei akuter motorischer axonaler Neuropathie richtet sich der Angriff gegen die Axolemma und die Ranvier-Schnürringe. Antikörper gegen GD<sub>1a</sub> binden sich selektiv an die Ranvier-Schnürringe der motorischen Nerven und nicht der Empfindungsnerven; dies weist auf ihre pathogene Rolle hin<sup>10</sup>.

Anti-GM<sub>1</sub>- und Anti-GD<sub>1b</sub>-Antikörper wurden auch bei Patienten mit multipler Sklerose (MS), systemischem Lupus erythematodes (SLE), Alzheimer-Krankheit und bei bestimmten normalen Personen nachgewiesen. Es ist wichtig, zu wissen, dass Anti-GM<sub>1</sub>-Antikörper und verwandte Antikörperspiegel mit Titern über 1:800 stark und spezifisch mit Erkrankungen des zweiten Motoneurons, sensorisch-motorischen Neuropathien und motorischen Neuropathien assoziiert sind<sup>11</sup>.

Autoimmune Reaktionen bei Patienten mit anderen Neuropathien können gegen GQ1b und Sulfatide - Ganglioside gerichtet sein<sup>7</sup>. GQ<sub>1b</sub>-Antikörper sind mit dem Miller-Fisher-Syndrom assoziiert, einer ungewöhnlichen Form von GBS, die Patienten mit *Ophthalmoplegie*, *Ataxie* und *Areflexie* betrifft, und folgen oft auf eine Infektion. Anti-Galaktocerebrosid-Antikörper scheinen eng mit Anti-Sulfatid-Antikörpern verwandt zu sein und wurden bei Patienten mit *lepröser Neuritis*, *afrikanischer Trypanosomiose* und mukokutaner Leishmaniose beobachtet.

Gangliosid-Antikörper mit klinischer Relevanz sind gewöhnlich vom Isotyp IgM und/oder IgG. Es wurde gezeigt, dass ein Plasmaaustausch eine wirksame therapeutische Maßnahme darstellt, wenn die Behandlung nicht später als zwei Wochen nach dem ersten Auftreten der Symptome begonnen wird<sup>12</sup>. Labortests, die auf einem frühen Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene Ganglioside basieren, können daher diese Therapien wirkungsvoll ergänzen.

## TESTPRINZIP

Die ImmuLisa™ Anti-Gangliosid-Antikörpertests werden als Festphasen-ELISA (enzymgekoppelte Immunabsorptionstests) durchgeführt. Mit gereinigtem Antigen beschichtete Mikrotitervertiefungen werden zur Inkubation von Kontrollseren, Kalibratoren und Patientenserumproben verwendet, um es den im Serum vorhandenen spezifischen Antikörpern zu ermöglichen, sich an das jeweilige Antigen zu binden. Ungebundene Antikörper und andere Serumproteine werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Nach der Zugabe von und Inkubation mit einem enzymmarkierten Anti-human-Konjugat wird ungebundenes Konjugat durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Die Zugabe von pNPP-Enzymsubstrat in die Vertiefungen führt zu einer Farbveränderung, die durch die Umwandlung des Substrats in ein gelbes Reaktionsprodukt entsteht. Die Reaktion wird gestoppt und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Der Antikörperkonzentrationsbereich ist auf dem Kalibrator und dem positiven Kontrollserum in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben. Diese Werte werden verwendet, um die Übereinstimmung mit den Testqualitätskontrollen nachzuprüfen und die qualitativen Werte zu bestimmen. Positive Ergebnisse für Proben sollten als Titer angegeben werden.

## REAGENZIEN

### Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.** Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. **Alle Reagenzien müssen während der Anwendung auf 2-8 °C gehalten werden**, mit Ausnahme des Enzymsubstrats, das vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden muss. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar.

### Vorsichtsmaßnahmen

Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis<sup>13</sup>.

WARNUNG – Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide

DE

bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Materialien aus anderen Quellen aus. Falls Sie zusätzliche Reagenzien benötigen, verwenden Sie nur Bestandteile mit derselben Chargennummer von Immco Diagnostics Inc. Befolgen Sie die Regeln der Guten Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien deren mikrobielle Verunreinigung und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

### Mitgelieferte Materialien

<b>Produkt</b>	<b>REF</b>
Anti-GM <sub>1</sub> IgM	1180M
Anti-GM <sub>1</sub> IgG	1180G
Anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgM	1181M
Anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgG	1181G
Anti-GD <sub>1b</sub> IgM	1183M
Anti-GD <sub>1b</sub> IgG	1183G
Anti-GQ <sub>1b</sub> IgM	1184M
Anti-GQ <sub>1b</sub> IgG	1184G
Anti-Galactocerebrosid IgM	1185M
Anti-Galactocerebrosid IgG	1185G
Anti-GD <sub>1a</sub> IgM	1186M
Anti-GD <sub>1a</sub> IgG	1186G

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> †	<b>Mikrotiterplatte mit</b> einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit gereinigtem Antigen beschichtet. Das Gangliosid-Antigen ist auf dem Etikett angegeben
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> * †	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator</b> ( <i>grüne Kappe</i> ). Aus Humanserum mit den Antikörpern gegen die jeweiligen Ganglioside hergestellt. Die Konzentration in EU/ml ist auf dem Etikett angegeben.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL +</b> * †	Gebrauchsfertiges <b>positives Kontrollserum</b> ( <i>rote Kappe</i> ). Enthält Humanserum, das für den jeweiligen Gangliosid-Antikörper positiv ist.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Gebrauchsfertiges <b>negatives Kontrollserum</b> ( <i>weiße Kappe</i> ). Enthält Gangliosid-Antikörper-negatives Humanserum.
1 x 12 ml	<b>CONJ ALKPHOS</b> * †	Gebrauchsfertiges <b>Anti-human-IgM- oder -IgG-alk.-Phos.-Konjugat</b> . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Serumverdünner</b> . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Gebrauchsfertiges <b>Enzymsubstrat</b> . Enthält pNPP. <b>Vor Licht schützen.</b>

DE

1 x 12 ml **STOP**

Gebrauchsfertige **Stopplösung**.

2 x **BUF** **WASH**

**Waschpuffer in Pulverform**. Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

\* Enthält <0,1% NaN<sub>3</sub>

† Das spezifische Antigen der Mikrotiterplatte und der spezifische Antikörper/Isotyp für jeden Kit dieser Produktfamilie sind untenstehend angegeben:

**REF** 1180M enthält Mikrotiterplatte für GM<sub>1</sub>, Kalibrator und Kontrollserum für GM<sub>1</sub> (IgM) und IgM-Konjugat

**REF** 1180G enthält Mikrotiterplatte GM<sub>1</sub>, Kalibrator und Kontrollserum für GM<sub>1</sub> (IgG) und IgG-Konjugat

**REF** 1181M enthält Mikrotiterplatte Asialo-GM<sub>1</sub>, Kalibrator und Kontrollserum für Asialo-GM<sub>1</sub> (IgM) und IgM-Konjugat

**REF** 1181G enthält Mikrotiterplatte Asialo-GM<sub>1</sub>, Kalibrator und Kontrollserum für Asialo-GM<sub>1</sub> (IgG) und IgG-Konjugat

**REF** 1183M enthält Mikrotiterplatte GD<sub>1b</sub>, Kalibrator und Kontrollserum für GD<sub>1b</sub> (IgM) und IgM-Konjugat

**REF** 1183G enthält Mikrotiterplatte GD<sub>1b</sub>, Kalibrator und Kontrollserum für GD<sub>1b</sub> (IgG) und IgG-Konjugat

**REF** 1184M enthält Mikrotiterplatte GQ<sub>1b</sub>, Kalibrator und Kontrollserum für GQ<sub>1b</sub> (IgM) und IgM-Konjugat

**REF** 1184G enthält Mikrotiterplatte GQ<sub>1b</sub>, Kalibrator und Kontrollserum für GQ<sub>1b</sub> (IgG) und IgG-Konjugat

**REF** 1185M enthält Mikrotiterplatte Galactocerebroside, Kalibrator und Kontrollserum für Galactocerebroside (IgM) und IgM-Konjugat

**REF** 1185G enthält Mikrotiterplatte Galactocerebroside, Kalibrator und Kontrollserum für Galactocerebroside (IgG) und IgG-Konjugat

**REF** 1186M enthält Mikrotiterplatte GD<sub>1a</sub>, Kalibrator und Kontrollserum für GD<sub>1a</sub> (IgM) und IgM-Konjugat

**REF** 1186G enthält Mikrotiterplatte GD<sub>1a</sub>, Kalibrator und Kontrollserum für GD<sub>1a</sub> (IgG) und IgG-Konjugat

#### Auf den Etiketten verwendete Symbole:

**LOT** Chargennummer

**REF** Bestellnummer

 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

**IVD** In-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

#### Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter

DE

- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

### PROBENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben bei -20 °C eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

### VERFAHREN

#### Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig die Produktbeilage, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; legen Sie die nicht verwendeten Vertiefungen im versiegelten Beutel sofort wieder in den Kühlschrank, um Kondensation in den zu vermeiden
- **Lassen Sie das Enzymsubstrat vor der Verwendung Raumtemperatur erreichen. Alle anderen Reagenzien, einschließlich des Waschpuffers, sollten bei 2-8 °C aufbewahrt und kalt verwendet werden.** Stellen Sie nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Verdünnen Sie die Patientenproben unmittelbar vor Beginn des Tests und bewahren Sie die Verdünnungen bis zu ihrer Verwendung bei 2-8 °C auf.
- Bereiten Sie den Waschpuffer zu und lassen Sie in eine Temperatur von 2-8 °C erreichen. Der Waschpuffer kann nicht erst unmittelbar vor dem Test zubereitet werden.
- **Eine gute Waschmethode ist unerlässlich und es wird die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers empfohlen.** Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl **kalten** Waschpuffer über alle Mikrotitervertiefungen spritzen. Das Waschen von Hand wird jedoch für diesen Test nicht empfohlen.
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in einen Streifen mit 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Das Pipettieren aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen; beginnen Sie die Zeitmessung aller Inkubationen mit dem Abschluss des Zufügens der Reagenzien. Jeder Inkubationszeitraum muss unabhängig von dem vorherigen gemessen werden.

#### Testverfahren

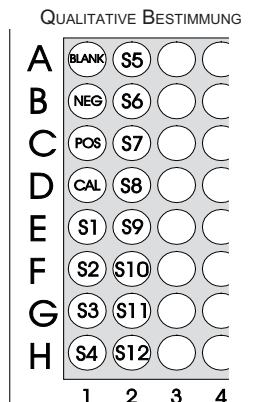
- Schritt 1** Behalten Sie für alle Reagenzien (mit Ausnahme des Enzymsubstrats) und für die Mikrotiterplattenstreifen bis einschließlich Schritt 11 dieses Tests eine Temperatur von 2-8 °C bei.
- Schritt 2** Verwenden Sie, wie in der nachfolgenden Abbildung gezeigt, den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.
- Schritt 3** Verdünnen Sie die Patientenserumproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** der Serumprobe mit **500 µl kaltem** Serumverdünner mischen.
- Schritt 4** Entnehmen Sie dem **kalten** Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht

verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Mikrotiterstreifen sicher in den mitgelieferten Halter ein.

**Anmerkung:** Bei der Durchführung der Schritte 1 bis 5 sollte die Mikrotiterplatte auf Eisbeutel gelegt werden, um die Temperatur von 2-8 °C aufrechtzuerhalten.

**Anmerkung:** Pipettieren Sie in eine Vertiefung **100 µl kalten** Serumverdünner als Blindprobe. Alle Schritte sollten schnell durchgeführt werden, um ein Aufwärmen der Vertiefungen und der Serumverdünnungen zu vermeiden.

- Schritt 5** Pipettieren Sie **100 µl kalten** gebrauchsfertigen Kalibrator sowie **kaltes** positives und negatives Kontrollserum in die Vertiefungen. Pipettieren Sie je **100 µl** der **kalten** verdünnten Patientenproben.



- Schritt 6** Inkubieren Sie **16-18 Stunden** lang (über Nacht) bei 2-8 °C.
- Schritt 7** Waschen Sie **4x** mit **kalt**em Waschpuffer. Füllen Sie zum manuellen Waschen jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Saugen Sie den Inhalt jeder Vertiefung ab. Drehen Sie die Mikrotiterplatte um und klopfen Sie sie über saugfähigen Papiertüchern vorsichtig ab. Lassen Sie die Platte etwa 1 Minute lang umgedreht, damit die gesamte Flüssigkeit aus den Vertiefungen abläuft. **Anmerkung: Klopfen Sie die Platte nicht kräftig sondern nur leicht ab, um die überschüssige Flüssigkeit aus den Vertiefungen zu entfernen. Halten Sie während dieses Vorgangs alle Streifen kalt.**
- Schritt 8** Pipettieren Sie **100 µl kaltes** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 9** Inkubieren Sie 2 Stunden bei 2-8 °C.
- Schritt 10** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 7 beschrieben.
- Schritt 11** Pipettieren Sie **100 µl auf Raumtemperatur gebrachtes Enzymsubstrat** in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 12** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 min) bei Raumtemperatur.
- Schritt 13** Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie die Extinktionswerte innerhalb einer Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.
- Schritt 14** Stellen Sie den ELISA-Reader gegen die Blindprobe auf Null. Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

#### Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf muss eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte <0,3 sein. Der Wert des positiven Kontrollserums in EU/ml sollte innerhalb des auf dem Etikett angegebenen Bereichs liegen. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Der Extinktionswert des Kalibrators muss größer als der des negativen Kontrollserums und kleiner als der des positiven Kontrollserums sein. Zur Verbesserung der Wiederholbarkeit können Proben zweifach getestet werden; die EU/ml werden dabei aus dem Mittelwert der Extinktionswerte der zweifachen Vertiefungen errechnet.

DE

## ERGEBNISSE

### Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

#### 1. QUALITATIV

Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse sollten als positiv oder negativ angegeben werden.

#### Ext. der Testprobe

\_\_\_\_\_ X EU/ml des Kalibrators = EU/ml der Testprobe

#### Ext. des Kalibrators

#### Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen. Diese können je nach der untersuchten Population schwanken.

Anti-Gangliosid-Wert	Interpretation
< 20 EU/ml	Negativ
20-25 EU/ml	Unbestimmt (Grenzbereich)
> 25 EU/ml	Positiv

#### 2. QUANTITATIV

Für Proben, die mit der qualitativen Methode für positiv befunden wurden, können quantitative Werte bestimmt werden. Quantitative Werte für positive Proben sollten als Titer der Probe angegeben werden<sup>14</sup>. Bereiten Sie zur Bestimmung des Titers von positiven Patienten von 1:101 ausgehend eine vierfache Verdünnungsreihe vor und führen Sie den Test wie im Abschnitt Testverfahren beschrieben durch. Die letzte Verdünnung mit einem EU/ml-Wert über 25 ist der Endpunkttiter des Patienten. Die nachfolgende Tabelle zeigt die korrekte Vorbereitung der vierfachen Verdünnungsreihe an:

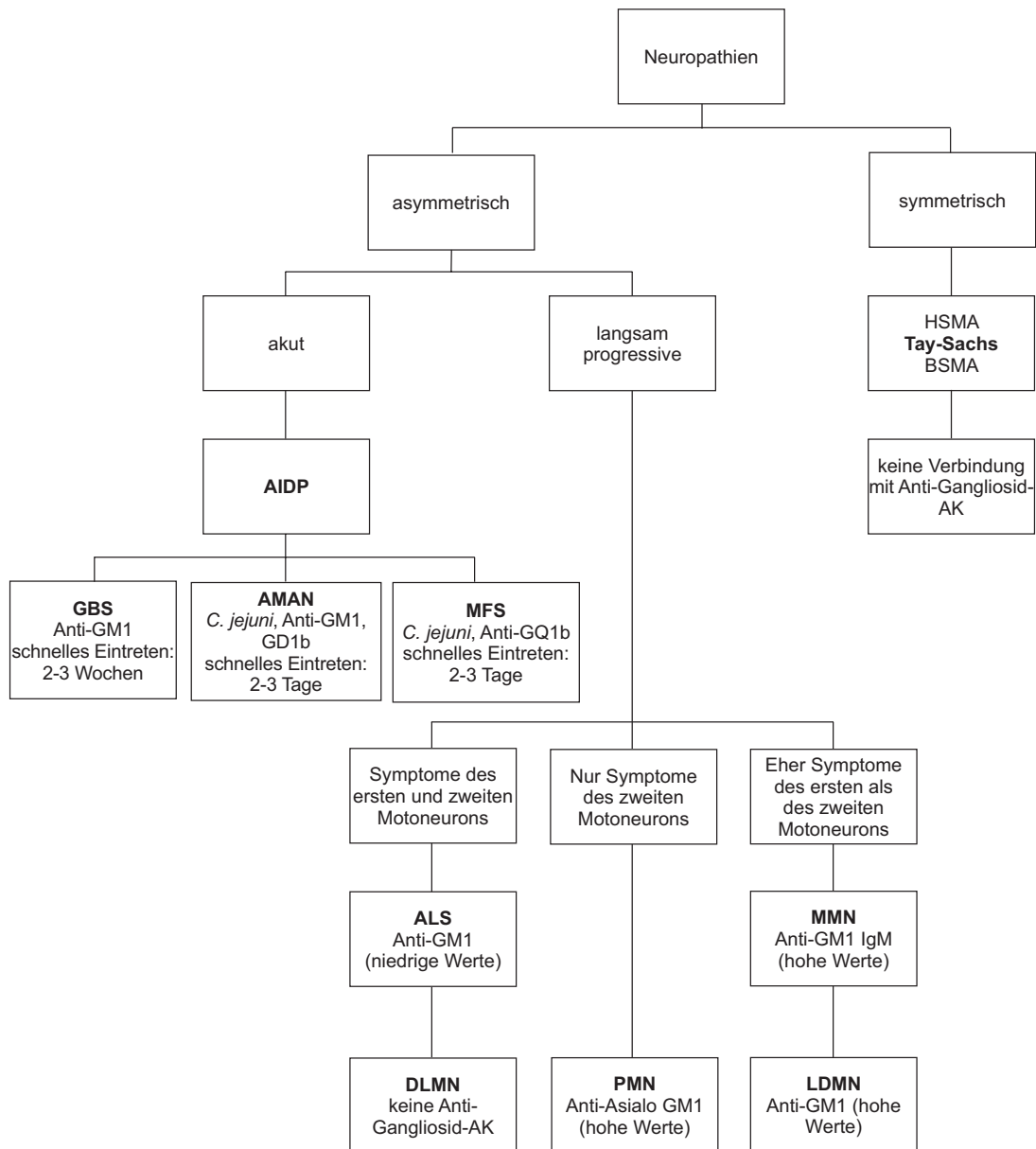
Röhrchen	1	2	3	4
Serum	10 µl			
	+			
Serumverdünner	1000 µl	800 µl	800 µl	800 µl
		⇄	⇄	⇄
Übertragung	200 µl	200 µl	200 µl	
Endverdünnung	1:100	~1:400	~1:1600	~1:6400

#### EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Die mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse sind nicht allein diagnostisch und sollten im Zusammenhang mit dem klinischen Zustand des Patienten betrachtet werden. Ein Test mit Reaktivität im Grenzbereich sollte erneut getestet werden, um das Ergebnis zu bestätigen. Es wird außerdem empfohlen, Patienten mit Ergebnissen im Grenzbereich nach einer weiteren Blutabnahme erneut zu testen. Eine Behandlung mit Immunsuppressiva, eine Plasmapherese, der Beginn oder die Änderung der Behandlung eines Patienten mit einer Neuropathie sollten nicht auf der Grundlage einer positiven Reaktion bei diesem Test stattfinden. Zusammen mit den Ergebnissen des Gangliosid-Tests sollten alle klinischen Beobachtungen, und insbesondere elektrophysiologische Daten wie Leitungsblöcke motorischer Nerven und andere verwandte Symptome, berücksichtigt werden. Das Serum einiger Patienten mit motorischen Neuropathien kann beim Test auf bestimmte Ganglioside negative Ergebnisse erbringen. Solche Patienten sollten auf Autoantikörper gegen andere Ganglioside hin getestet werden.

#### ERWARTETE WERTE

Das nachfolgende Flussdiagramm zeigt das Vorliegen von Anti-Gangliosid-Antikörpern bei einigen gut charakterisierten Neuropathien<sup>17</sup>. Dieses Diagramm dient nur als Hilfsmittel bei der Differentialdiagnose und sollte nicht als endgültige Information über alle aufgeführten Neuropathien verwendet werden. Siehe Einschränkungen des Verfahrens.



### Legende

- GBS = Guillain-Barré-Syndrom
- AMAN = Akute motorische axonale Neuropathie
- MFS = Miller-Fisher-Syndrom
- ALS = Amyotrophische laterale Sklerose
- MMN = Multifokale Motorneuropathie
- HSMA = Hereditäre spinale Muskelatrophie
- LDMN = Distales Syndrom des zweiten Motoneurons
- PMN = Proximales Motoneuron-Syndrom
- DLMN = Diffuses Syndrom des zweiten Motoneurons
- AIDP = Akute entzündliche demyelinisierende Polyneuropathie



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

## Anticorps Ganglioside ELISA

IVD

### ENCART DU PRODUIT

<b>REF</b>	1180M anti-GM <sub>1</sub> IgM 96 Tests
<b>REF</b>	1180G anti-GM <sub>1</sub> IgG 96 Tests
<b>REF</b>	1181M anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgM 96 Tests
<b>REF</b>	1181G anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgG 96 Tests
<b>REF</b>	1183M anti-GD <sub>1a</sub> IgM 96 Tests
<b>REF</b>	1183G anti-GD <sub>1a</sub> IgG 96 Tests
<b>REF</b>	1184M anti-GQ <sub>1b</sub> IgM 96 Tests
<b>REF</b>	1184G anti-GQ <sub>1b</sub> IgG 96 Tests
<b>REF</b>	1185M anti-Galactocérébroside IgM 96 Tests
<b>REF</b>	1185G anti-Galactocérébroside IgG 96 Tests
<b>REF</b>	1186M anti-GD <sub>1a</sub> IgM 96 Tests
<b>REF</b>	1186G anti-GD <sub>1a</sub> IgG 96 Tests

### USAGE PREVU

Ces tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection et la semi-quantification des anticorps de gangliosides dans le sérum humain peuvent être utilisés comme aide pour le diagnostic de *désordres neuromusculaires et de neuropathies*.

### RESUME ET EXPLICATIONS

Les *Gangliosides* sont des *acides glycosphingolipides* localisés dans la partie extérieure de la membrane plasmique et se retrouvent dans une variété de *neuropathies et de désordres neuromusculaires*. Les *neuropathies* peuvent être généralement débilantes, et si elles atteignent des organes vitaux, létales. Elles peuvent être héréditaires, dues à une infection ou à une maladie auto-immunitaire et peuvent avoir des symptômes similaires et sont donc difficiles à diagnostiquer. Un diagnostic précis est important car les pronostics et les modalités de traitement peuvent être différents suivant les types de neuropathies<sup>1</sup>.

Certaines neuropathies, en particulier le Syndrome de Guillain-Barré (GBS), sont plus caractérisées que d'autres. Le GBS se réfère à un désordre auto-immunitaire caractérisé par un affaiblissement rapide des membres, une perte du réflexe des tendons et des dysfonctionnements sensoriels. Le GBS est une neuropathie inflammatoire aiguë. Les patients souffrant de GBS présentent des anticorps aux gangliosides GM<sub>1</sub><sup>2,3</sup>. Ces anticorps sont signalés chez les patients avec dégâts axonaux importants et pronostic faible et sont dirigés contre la structure galactose-galactosamine de la portion carbohydrate de la molécule<sup>4</sup>. Le GBS est un désordre typique de post infection, auto-immunitaire. Plus de deux tiers des patients souffrant de GBS ont des antécédents d'infection, généralement par des virus et des bactéries. Le *Cytomégalo*virus associé à des infections de la partie supérieure de l'appareil respiratoire et *Clampy*bacter *jejunii* associé à des *gastroentérites*, entament une réaction immunitaire croisée contre les gangliosides, résultant en une réaction immunitaire complexe et une démyélinisation des nerfs aboutissant à une plus lente conduction de l'influx ou à un blocage de ce dernier<sup>5</sup>.

GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> et asialo GM<sub>1</sub> partagent le même terminal Gal (β1-3) des résidus GalNAc. Une augmentation du titre des anticorps IgM contre les GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> et asialo GM<sub>1</sub> a été mise en évidence dans différents types de moto-neuropathies<sup>6</sup>. Parmi ceux-ci, le anti-GM<sub>1</sub>, qui est préférentiellement observé dans les cas de maladies neuro-motrices diffuses et jamais dans les neuropathies de l'appareil moteur inférieur<sup>7</sup>. Cette observation permet de distinguer ces derniers des anti-GD<sub>1b</sub> et asialo GM<sub>1</sub> qui sont préférentiellement observés dans les cas de neuropathies des membres inférieurs.

Actuellement, des profils sérologiques et des anticorps anti-gangliosides chez des patients GBS traités et non traités ont été signalés<sup>8</sup>. Des titres de anti-GM<sub>1</sub> IgG et anti-GD<sub>1a</sub> ont atteint leur maximum respectivement à 40 et 90 jours. Les titres anti-GM<sub>1</sub> IgG ont diminué en suivant le traitement Ivlg. L'utilité clinique de ces anticorps est démontrée par la corrélation des pics d'anticorps avec les moments les plus critiques et les symptômes cliniques les plus marqués<sup>8</sup>. Les anticorps anti-GD<sub>1a</sub> sont également présents chez 23% des patients avec Sclérose en plaques (MS) et 18% avec Névrite Optique (ON)<sup>9</sup>. Les réponses croissantes de GD<sub>1a</sub> IgG peuvent être utilisées

comme facteur discriminant entre la MS et le GBS<sup>9</sup>. Des études immuno-pathologiques suggèrent que la cible des attaques immunitaires est différente pour les différents sous-types de GBS. Dans la neuropathie motrice axonale aiguë, l'attaque est dirigée contre l'axolème et les noeuds de Ranvier. Les anticorps anti- GD<sub>1a</sub> se lient de façon sélective aux noeuds des nerfs moteurs plutôt qu'aux noeuds de Ranvier des nerfs sensoriels, ce qui suggère leur rôle pathogène<sup>10</sup>.

Les anticorps anti-GM<sub>1</sub> et anti-GD<sub>1b</sub> ont également été signalés chez des patients avec sclérose en plaque (ALS), lupus érythémateux endémique, maladie d'Alzheimer et chez certains individus en bonne santé. Il est important de noter que les anti-GM<sub>1</sub> et les anticorps relatifs présentant un titre de plus de 1:800 sont très fortement et spécifiquement associés avec des maladies neurologiques de l'appareil moteur inférieur, des neuropathies sensorimotrices et des neuropathies motrices<sup>11</sup>.

Les réponses immunitaires chez les patients souffrant d'autres neuropathies peuvent être dirigées contre les GQ<sub>1b</sub> et les gangliosides sulfatés<sup>7</sup>. Les anticorps GQ<sub>1b</sub> sont associés avec le syndrome de Miller Fisher, une variante habituelle de GBS, affectant les patients d'*ophtalmoplégie, ataxie et aréflexie* et suivent généralement un épisode infectieux. Les anticorps anti-galactocérobrosides semblent être étroitement associés aux anticorps anti-sulfatés et ont été observés chez des patients atteints de leprose *névrite, Trypanosome africain et leishmaniose mucocutanée*.

Les anticorps gangliosides sont généralement du type IgM, IgG et IgA. Il a été démontré que l'échange de plasma est une mesure thérapeutique effective, si elle est réalisée moins de 2 semaines après le début des symptômes<sup>12</sup>. Donc, les tests de laboratoire basés sur une détection précoce des anticorps de différents gangliosides peut effectivement compléter de telles thérapies.

## PRINCIPES DES TESTS

Les tests Immulisa™ anticorps anti-ganglioside sont réalisés comme une phase solide ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays). Des puits recouverts d'antigène recombinant sont utilisés pour incuber les contrôles, les étalons et les sérums de patients pour permettre aux anticorps présents dans le sérum de se lier à leur antigène respectif. Les anticorps non-liés et les autres protéines du sérum sont éliminés en rinçant les micropuits. Après l'ajout et l'incubation d'un conjugué enzymatique anti- Ig humaines, le conjugué non-lié est éliminé en rinçant les micropuits. L'ajout du substrat enzymatique pNPP aux micropuits entraîne un changement de couleur produit par la conversion du substrat en un produit de réaction jaune. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration de l'anticorps, est lue sur un spectrophotomètre à 405 nm. La gamme de concentration de l'anticorps est exprimée en Unités ELISA par millilitres (EU/ml) sur l'étalon et la solution de contrôle positive. Ces valeurs sont utilisées pour vérifier la conformité avec les tests de contrôle qualité et pour déterminer les résultats qualitatifs. Les spécimens positifs doivent être exprimés en titre.

## REACTIFS

### Conservation et préparation

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas employer le réactif s'il est trouble ou si un précipité s'est formé. **Tous les réactifs doivent être maintenus entre 2 et 8°C tout au long de leur utilisation**, à l'exception du Substrat Enzymatique, qui doit être porté à température ambiante (20-25°C) avant de l'utiliser. Lorsqu'il est conservé entre 2 et 8°C, le tampon de lavage reconstitué est stable jusqu'à la date limite d'utilisation.

### Précautions

Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage<sup>13</sup>.

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation

FR

et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit par d'autres provenant d'autres fabricants. Si des réactifs supplémentaires sont nécessaires, utiliser uniquement les composants avec le même numéro de lot provenant de Immco Diagnostics Inc.

Respecter les techniques de laboratoire réduisant au minimum la contamination microbienne et chimique.

Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption se trouvant sur l'étiquette.

### Matériel fourni

<b>Produit</b>	<b>REF</b>
anti-GM <sub>1</sub> IgM	1180M
anti-GM <sub>1</sub> IgG	1180G
anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgM	1181M
anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgG	1181G
anti-GD <sub>1b</sub> IgM	1183M
anti-GD <sub>1b</sub> IgG	1183G
anti-GQ <sub>1b</sub> IgM	1184M
anti-GQ <sub>1b</sub> IgG	1184G
anti-Galactocérébroside IgM	1185M
anti-Galactocérébroside IgG	1185G
anti-GD <sub>1a</sub> IgM	1186M
anti-GD <sub>1a</sub> IgG	1186G

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8 **MICROPLATE** †

**Micro-lamelle** avec micropuits individuels recouverts d'antigène purifié. L'antigène Ganglioside est indiqué sur l'étiquette.

1 x 1.5 ml **CALIBRATOR** \* †

**Etalon** (*couvercle vert*), prêt à l'emploi. Dérive du sérum humain contenant les anticorps gangliosides. La concentration en EU/ml est imprimée sur l'étiquette du flacon.

1 x 1.5 ml **CONTROL +** \* †

**Contrôle positif** (*couvercle rouge*), prêt à l'emploi. Contient du sérum humain positif aux anticorps ganglioside.

1 x 1.5 ml **CONTROL -** \*

**Contrôle négatif** (*couvercle blanc*), prêt à l'emploi. Contient du sérum humain négatif aux anticorps ganglioside.

1 x 12 ml **CONJ ALKPHOS** \* †

**Conjugué phos. alc anti-IgG ou IgM humain.** Prêt à l'emploi. Code couleur rose.

1 x 60 ml **DIL** \*

**Diluant pour sérum** prêt à l'emploi. Code couleur bleue.

FR






1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrat enzymatique</b> prêt à l'emploi. Contient du pNPP. <b>Protéger de la lumière.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solution d'arrêt</b> prête à l'emploi.
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Tampon de lavage</b> en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

\* Contient <0.1% NaN<sub>3</sub>

† L'antigène et l'anticorps/isotype spécifique de la micro-lamelle pour chaque kit dans cette famille de produits est indiqué ci-dessous:

- REF** 1180M contient la micro-lamelle pour GM<sub>1</sub>, étalon et solutions de contrôle pour GM<sub>1</sub> IgM et conjugué IgM
- REF** 1180G contient la micro-lamelle pour GM<sub>1</sub>, étalon et solutions de contrôle pour GM<sub>1</sub> IgG et conjugué IgG
- REF** 1181M contient la micro-lamelle pour Asialo GM<sub>1</sub>, étalon et solutions de contrôle pour Asialo GM<sub>1</sub> IgM et conjugué IgM
- REF** 1181G contient la micro-lamelle pour Asialo GM<sub>1</sub>, étalon et solutions de contrôle pour Asialo GM<sub>1</sub> IgG et conjugué IgG
- REF** 1183M contient la micro-lamelle pour GD<sub>1b</sub>, étalon et solutions de contrôle pour GD<sub>1b</sub> IgM et conjugué IgM
- REF** 1183G contient la micro-lamelle pour GD<sub>1b</sub>, étalon et solutions de contrôle pour GD<sub>1b</sub> IgG et conjugué IgG
- REF** 1184M contient la micro-lamelle pour GQ<sub>1b</sub>, étalon et solutions de contrôle pour GQ<sub>1b</sub> IgM et conjugué IgM
- REF** 1184G contient la micro-lamelle pour GQ<sub>1b</sub>, étalon et solutions de contrôle pour GQ<sub>1b</sub> IgG et conjugué IgG
- REF** 1185M contient la micro-lamelle pour Galactocérébroside, étalon et solutions de contrôle pour Galactocérébroside IgM et conjugué IgM
- REF** 1185G contient la micro-lamelle pour Galactocérébroside, étalon et solutions de contrôle pour Galactocérébroside IgG et conjugué IgG
- REF** 1186M contient la micro-lamelle pour GD<sub>1a</sub>, étalon et solutions de contrôle pour GD<sub>1a</sub> IgM et conjugué IgM
- REF** 1186G contient la micro-lamelle pour GD<sub>1a</sub>, étalon et solutions de contrôle pour GD<sub>1a</sub> IgG et conjugué IgG

#### **Symboles utilisés sur les étiquettes:**

- LOT** Numéro de lot
- REF** Numéro de référence catalogue
-  A utiliser avant
-  Température de conservation
-  Lire les instructions d'utilisation
- IVD** Pour usage diagnostique In vitro
-  Fabricant
-  Nombre de tests

#### **Matériel nécessaire mais non fourni**

- Eau distillée ou déionisée
- Pissette pour le tampon de lavage dilué
- Pipettes de 5 à 1000 µl

FR

- Bouts de pipette jetables
- Petits tubes propres 12 X 75 mm et porte-tubes
- Timer
- Papier absorbant
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm. Si la longueur d'onde double est disponible, le filtre de référence sera de 600-650 nm.
- Bac pour le lavage automatique capable de dispenser 200 µl

## PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

## METHODE

### Préparation du test

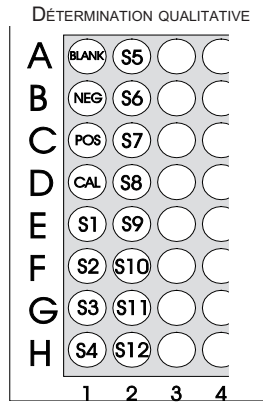
- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient contenant le dessiccateur, refermer hermétiquement pour minimiser toute exposition à l'humidité. Replacer immédiatement le récipient au réfrigérateur.
- **Laisser le substrat enzymatique s'équilibrer à la température de la pièce avant utilisation. Tous les autres réactifs, le tampon salin également, doivent être conservés entre 2 et 8°C et utilisés froids.** Replacer les produits au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- Préparer le tampon salin et équilibrer sa température entre 2 et 8 °C. Le tampon salin ne peut être préparé juste avant de réaliser le test.
- **Il est important d'utiliser une bonne technique de lavage. Il est recommandé d'utiliser un bac de lavage des micro-lamelles automatique.** Si l'opération est réalisée manuellement, diriger un jet puissant de vapeur de tampon de lavage **froid** à l'aide d'une large bouteille sur toute la superficie de la micro-lamelle. De toute façon, le lavage manuel n'est pas recommandé pour ce test.
- Utiliser une pipette multicanaux capable de remplir 8 puits simultanément. Ceci rend le processus plus rapide et fournit un temps d'incubation plus uniforme.
- La synchronisation est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution des réactifs. L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit être réalisé à la même cadence et selon la même séquence. Chaque période d'incubation doit être mesurée indépendamment de la précédente.

### Exécution du test

- Etape 1** Maintenir tous les réactifs (à l'exception du substrat enzymatique) et les tiges de microtitration entre 2 et 8°C jusqu'à l'étape 11 du test.
- Etape 2** Indiquer sur une feuille du protocole la position des échantillons sur la micro-lamelle. Il est de bonne pratique de vérifier les échantillons en double.
- Etape 3** Préparer une dilution de **1:101** de l'échantillon patient en mélangeant **5 µl** de l'échantillon patient à **500 µl** de diluant pour échantillons **froid**.
- Etape 4** Prélever les micro-lamelles nécessaires du récipient **froid** et replacer les lamelles non utilisées dans le récipient scellé au réfrigérateur. Placer les micro-lamelles sur le support fourni.  
**Note** : Lors de la réalisation des étapes 1 à 5, la micro-lamelle doit être maintenue sur de la glace pour maintenir la température entre 2 et 8 °C.

**Note:** Pipeter **100 µl** de Diluant Sérum **froid** dans un micropuit comme blanco de réaction. Toutes les étapes doivent être réalisées rapidement pour éviter le réchauffement des micropuits et des dilutions du sérum.

**Etape 5** Pipeter **100 µl** d'Etalon et de Contrôles positifs et négatifs prêts à l'emploi **froid** dans les micropuits. Pipeter **100 µl** d'échantillons dilués **froid**.



**Etape 6** Incuber pendant 16 à 18 heures (une nuit) entre 2 et 8°C.

**Etape 7** Laver **4x** avec de la solution de lavage **froide**. Pour le lavage à la main, remplir chaque micropuit avec de la solution de lavage reconstituée. Aspirer le contenu de chaque puit. Retourner la micro-lamelle et vider par petits coups sur du papier absorbant. Maintenir à l'envers pendant environ 1 minute pour éliminer les liquides des micropuits. **Note: ne pas taper vigoureusement, donner des petits coups pour éliminer l'excès de liquide dans les puits. Maintenir toutes les tigettes froides durant cette opération.**

**Etape 8** Pipeter **100 µl** de Conjugué **froid** dans les micropuits.

**Etape 9** Incuber pendant 2 heures entre 2 et 8°C.

**Etape 10** Laver les micropuits comme à l'étape 7.

**Etape 11** Pipeter **100 µl** de **Substrat Enzymatique à température ambiante** dans chaque micropuit dans le même ordre et timing que pour le conjugué.

**Etape 12** Incuber pendant **30 minutes** ( $\pm 5$  min) à température ambiante.

**Etape 13** Pipeter 100 µl de **solution d'arrêt** dans chaque puit. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire la densité optique dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.

**Etape 14** Le zéro ELISA est la valeur du blanco. Lire la densité optique de chaque puit à **405nm** en utilisant un lecteur simple ou à longueur d'onde double à **405/630nm**.

### Contrôle Qualité

Un blanco de réaction doit être utilisé dans chaque test pour vérifier l'intégrité et la précision de ce dernier. La lecture de densité optique du blanco doit être inférieure à 0.3. Les EU/ml de la Solution de Contrôle Positive doivent se trouver dans la gamme indiquée sur l'étiquette. Le contrôle négatif doit être  $< 20$  EU/ml. La densité optique de l'étalon doit être plus grande que celle du contrôle négatif et plus petite que celle du contrôle positif. Pour une plus grande répétitivité, le test peut être réalisé en double et les EU/ml calculés en prenant la moyenne des deux lectures pour les puits dupliqués.

### RESULTATS

#### Calculs

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

## 1. QUALITATIVE

Les résultats obtenus par cette méthode seront négatifs ou positifs.

### Abs. de l'échantillon

----- X EU/ml de l'étalon = EU/ml de l'échantillon

### Abs. de l'étalon

### Interprétation

L'information suivante sert seulement de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Ces dernières peuvent varier en fonction de la population analysée.

Valeur Anti-Ganglioside	Interprétation
< 20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	Indéterminé (Limite)
>25 EU/ml	Positif

## 2. QUANTITATIVE

Les valeurs quantitatives peuvent être déterminées pour les échantillons testés positifs par la méthode qualitative. Les valeurs quantitatives des échantillons positifs doivent être exprimées en titre de l'échantillon.<sup>14</sup> Pour déterminer le titre des patients positifs, réaliser 4 dilutions en série de l'échantillon en partant de 1:101 et réaliser le test comme indiqué dans la méthode de test. La dernière dilution qui présente plus de 25 EU/ml est le point de titration du patient. Le tableau ci-dessous indique la préparation correcte de la série de dilution.

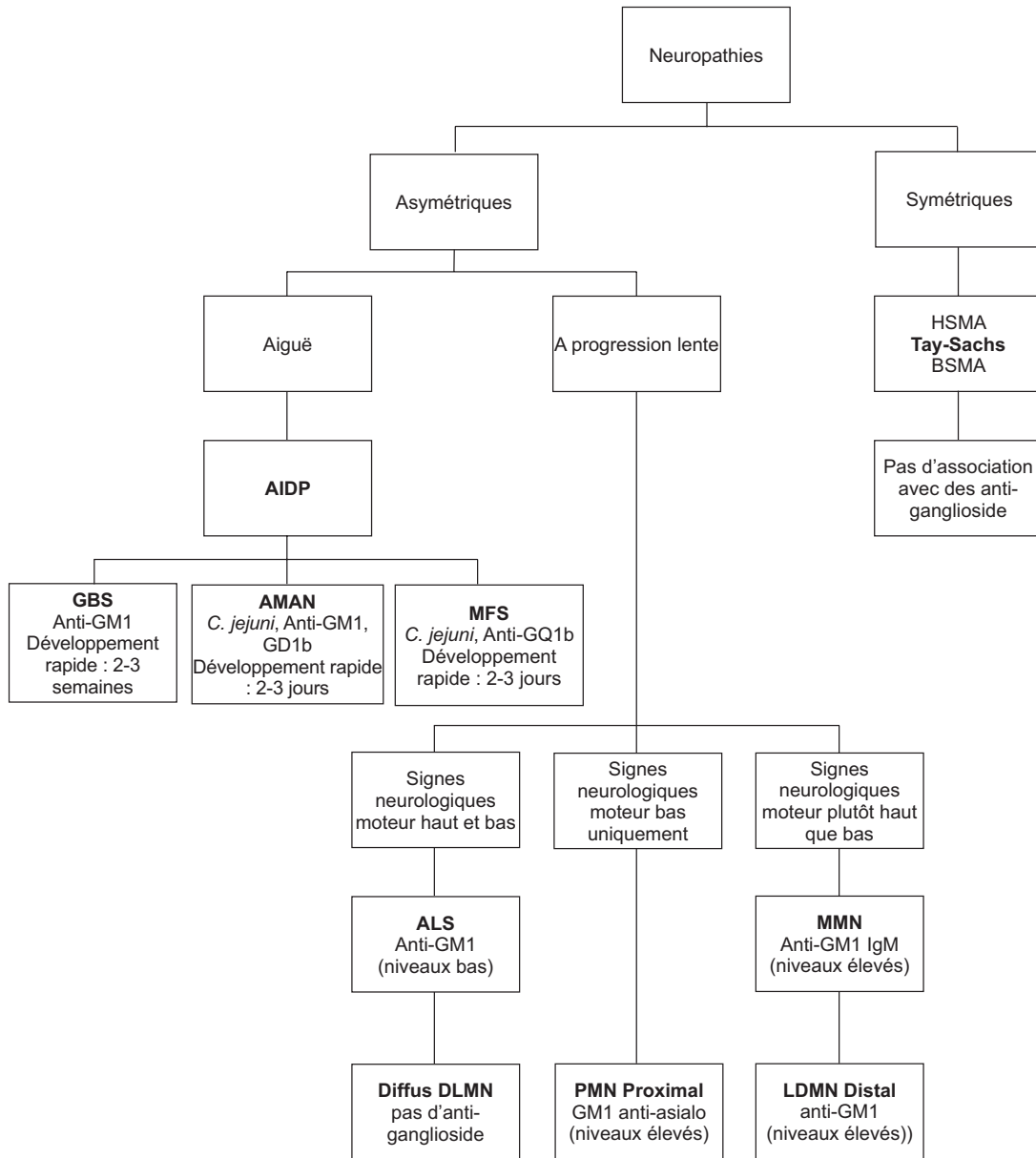
Tubes	1	2	3	4
Sérum	10 µl			
	+			
Diluant Sérum	1000 µl	800 µl	800 µl	800 µl
		⇄	⇄	⇄
Transfert	200 µl	200 µl	200 µl	
Dilution Finale	1:100	~1:400	~1:1600	~1:6400

### LIMITES D'UTILISATION

Les résultats obtenus servent seulement d'aide dans le diagnostique et ne devraient pas être interprétés en tant que diagnostique à part entière. Chaque test indéterminé doit être réalisé à nouveau pour confirmer le résultat. Il est également recommandé que les patients avec des résultats indéterminés soient retestés à intervalles réguliers. Une thérapie immunosuppressive, plasmaphérèse, un début ou une modification de traitement chez un patient souffrant de neuropathie ne doivent pas être décidés sur la base d'une recherche anticorps positive mais confrontés attentivement aux observations cliniques. Il faut prendre en considération les données électro-physiologiques telles que le blocage de la conduction des nerfs moteur ou tout autre symptôme lié. Le sérum des patients souffrant de neuropathies peut être négatif pour certains gangliosides. Ces patients doivent être retestés pour les anticorps des autres gangliosides.

### VALEURS PREVUES

Le graphique suivant montre la présence des anticorps anti-gangliosides dans certaines neuropathies bien caractérisées<sup>1,7</sup>. Ce graphique sert uniquement comme aide dans le diagnostique et ne doit pas être considéré comme information conclusive des neuropathies citées. Voir limites d'utilisation.



**Légende**

- GBS = Syndrome Guillain-Barré
- AMAN = Neuropathie Moteur Axonale Aiguë
- MFS = Syndrome Miller-Fisher
- ALS = Sclérose Latérale Amyotrophique
- MMN = Neuropathie Moteur Multifocale
- HSMA = Atrophie Musculaire Spinale Héréditaire
- LDMN = Syndrome Neurone Moteur Distal Bas
- PMN = Syndrome Neurone Moteur Proximal
- DLMN = Syndrome Neurone Moteur Bas Diffus
- AIDP = Polyneuropathie Démyélinante Inflammatoire Aiguë



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

## Anticorpi Anti-gangliosidi ELISA

IVD

### INSERTO DEL PRODOTTO

**REF** 1180M anti-GM<sub>1</sub> IgM 96 Determinazioni

**REF** 1180G anti-GM<sub>1</sub> IgG 96 Determinazioni

**REF** 1181M anti-Asialo GM<sub>1</sub> IgM 96 Determinazioni

**REF** 1181G anti-Asialo GM<sub>1</sub> IgG 96 Determinazioni

**REF** 1183M anti-GD<sub>1b</sub> IgM 96 Determinazioni

**REF** 1183G anti-GD<sub>1b</sub> IgG 96 Determinazioni

**REF** 1184M anti-GQ<sub>1b</sub> IgM 96 Determinazioni

**REF** 1184G anti-GQ<sub>1b</sub> IgG 96 Determinazioni

**REF** 1185M anti-Galactocerebroside IgM 96 Determinazioni

**REF** 1185G anti-Galactocerebroside IgG 96 Determinazioni

**REF** 1186M anti-GD<sub>1a</sub> IgM 96 Determinazioni

**REF** 1186G anti-GD<sub>1a</sub> IgG 96 Determinazioni

### FINALITA' D'USO

Questi test immunoenzimatici (ELISA) sono stati sviluppati per la rilevazione semiquantitativa di anticorpi anti-gangliosidi nel siero umano da usare in congiunzione alle evidenze cliniche in pazienti con disturbi motori-neuronali/neuropatie.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

I gangliosidi sono glicosfingolipidi acidi localizzati sullo strato esterno delle membrane plasmatiche e sono presenti in una serie di disturbi motori/neuronali/neuropatie. Le neuropatie possono essere generalmente debilitanti e in alcuni casi fatali se colpiscono le funzioni vitali dell'organo. Le neuropatie possono essere condizioni ereditarie o derivare da un'infezione o da una patologia autoimmune. Varie neuropatie presentano spesso sintomi simili e sono quindi difficili da diagnosticare. Una diagnosi accurata è importante in quanto la modalità di trattamento appropriata e la prognosi possono differire a seconda della particolare neuropatia<sup>1</sup>.

Alcune neuropatie, in particolare la sindrome di Guillain-Barré (GBS), hanno una migliore caratterizzazione di altre. La GBS è una patologia autoimmune che provoca un rapido indebolimento delle membra e la perdita dei riflessi tendinei oltre a disfunzioni sensoriali. La GBS è una neuropatia infiammatoria acuta. I pazienti con GBS sviluppano anticorpi anti-gangliosidi GM<sub>1</sub><sup>2,3</sup>. Questi anticorpi sono riportati in pazienti con gravi danni assonali e sono diretti contro la struttura galattosio-galattosamina della porzione carboidratica della molecola<sup>4</sup>. La GBS è un tipico disturbo autoimmune post infezione. Più dei due terzi di pazienti con GBS riportano un'infezione antecedente, solitamente mediata da un virus o da un batterio. Il *Cytomegalovirus associato con le infezioni del tratto respiratorio superiore e il Campylobacter jejuni* associato con la gastroenterite, avviano una risposta autoimmune a reattività incrociata diretta contro i gangliosidi che da luogo alla deposizione del complesso immune e alla demielinizzazione dei nervi, ciò porta a un rallentamento nella conduzione nervosa o all'arresto di quest'ultima.

GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> e Asialo GM<sub>1</sub> condividono gli stessi residui terminali Gal (β1-3) GalNAc. La coesistenza di titoli elevati di anticorpi IgM anti-GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> e Asialo GM<sub>1</sub> si verifica in vari tipi di motoneuropatie<sup>6</sup>. Tra questi, gli anticorpi anti-GM<sub>1</sub> sono di preferenza associati con motoneuropatie multifocali e non si osservano in patologie motoneuronali inferiori<sup>7</sup>. Questa osservazione distingue i due tipi di anticorpi da quelli anti-GD<sub>1b</sub> e anti-Asialo GM<sub>1</sub>, che si osservano in prevalenza in casi di patologie motoneuronali inferiori.

Sono stati riportati i profili sierologici per gli anticorpi anti-gangliosidi in pazienti con GBS in trattamento e non trattati<sup>8</sup>. Il picco di anticorpi anti-GM<sub>1</sub> IgG e anti-GD<sub>1a</sub> IgM nei titoli è al suo massimo rispettivamente intorno ai 40 e ai 90 giorni successivi al trattamento. I titoli degli anticorpi anti-GM<sub>1</sub> IgG diminuiscono in seguito a trattamento intravenoso con immunoglobulina (IVIg). L'utilità clinica di questi anticorpi è dimostrata dalla correlazione tra i picchi anticorpali e i punteggi alti di disabilità e il peggiore esito clinico<sup>8</sup>. Gli anticorpi anti-GD<sub>1a</sub> IgG compaiono inoltre nel 23% dei pazienti con sclerosi multipla (MS) e nel 18% dei pazienti con neurite ottica (ON)<sup>9</sup>. L'aumento delle risposte GD<sub>1a</sub> IgG può essere usato come fattore discriminante tra la MS e la GBS<sup>9</sup>. Studi immunopatologici suggeriscono

che nei vari sottotipi di GBS, il bersaglio dell'attacco immune è diverso. Nella neuropatia acuta assonale motoria, l'attacco è diretto contro l'asseolemma e i nodi di Ranvier. Gli anticorpi anti-GD<sub>1a</sub> si legano in modo selettivo ai nodi del nervo motorio piuttosto che ai nodi di Ranvier del nervo sensoriale, suggerendo un ruolo patogenico<sup>10</sup>.

Gli anticorpi anti-GM<sub>1</sub> e anti-GD<sub>1b</sub> sono stati inoltre riportati in pazienti con sclerosi multipla (MS), lupus eritematoso sistemico (LES), Morbo di Alzheimer e in alcuni individui normali. È importante notare che livelli di anticorpi anti-GM<sub>1</sub> e correlati, con titolo superiore a 1:800, sono fortemente e specificamente associati con malattie motorie-neuronali inferiori, con neuropatie motorie-sensoriali e motoneuropatia<sup>11</sup>.

Le risposte autoimmuni in pazienti affetti da altre neuropatie possono essere dirette contro GQ<sub>1b</sub> e sulfatidi<sup>7</sup>. Gli anticorpi GQ<sub>1b</sub> sono associati con la sindrome di Miller Fisher, una variante insolita della GBS, che colpisce pazienti con oftalmoplegia, atassia e areflessia e spesso si manifesta in seguito ad un episodio infettivo. Gli anticorpi anti-galattocerebrosidi sembrano essere fortemente collegati agli anticorpi anti-sulfatidi e sono stati osservati in pazienti con neurite leprosa, tripanosomiasi africana e leishmaniosi mucocutanea.

Gli anticorpi anti-gangliosidi con significatività clinica sono spesso dell'isotipo IgM e/o IgG. È stato dimostrato che la terapia trasfusionale con plasma è una misura terapeutica efficace se intrapresa non più tardi di due settimane dopo l'esordio dei sintomi<sup>12</sup>. Pertanto, i test di laboratorio che si basano sull'individuazione precoce degli anticorpi diretti contro i vari gangliosidi possono rappresentare un complemento efficace di queste terapie.

## PRINCIPI DELLE METODICHE

I test anti-ganglioside ImmuLis<sup>™</sup> vengono eseguiti come test immunoenzimatici (ELISA) in fase solida. Per l'incubazione di Controlli, Calibratori e sieri dei pazienti vengono utilizzati pozzetti rivestiti con antigene purificato per consentire il legame degli anticorpi presenti nel siero al rispettivo antigene. Gli anticorpi non legati e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Dopo l'aggiunta e l'incubazione di un coniugato anti-IgG e/o IgM umano marcato con enzima, il coniugato non legato viene rimosso lavando i pozzetti. L'aggiunta nei pozzetti di un substrato enzimatico pNPP produce un cambiamento di colore che è il risultato dalla conversione del substrato in un prodotto della reazione di colore giallo. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. Il range della concentrazione dell'anticorpo è espresso in unità ELISA (EU/ml) sul calibratore e sul controllo positivo. Questi valori vengono usati per determinare la conformità con i controlli di qualità dell'analisi e per determinare i risultati qualitativi. I risultati dei campioni positivi devono essere espressi come titolo.

## REAGENTI

### Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.** Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. **Tutti i reagenti devono essere mantenuti a una temperatura tra 2-8°C durante l'esecuzione della procedura** ad eccezione del substrato enzimatico che deve essere portato a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit.

### Precauzioni

Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali<sup>13</sup>.

**ATTENZIONE** – L'azide sodica (NaN<sub>3</sub>) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Non sostituire i componenti del kit con materiali di altri produttori. Se sono necessari quantitativi ulteriori di reagenti, usare solo componenti Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Seguire una buona prassi di laboratorio per ridurre al minimo la contaminazione microbica e crociata di reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

IT

### Materiali forniti

<b>Prodotto</b>	<b>REF</b>
anti-GM <sub>1</sub> IgM	1180M
anti-GM <sub>1</sub> IgG	1180G
anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgM	1181M
anti-Asialo GM <sub>1</sub> IgG	1181G
anti-GD <sub>1b</sub> IgM	1183M
anti-GD <sub>1b</sub> IgG	1183G
anti-GQ <sub>1b</sub> IgM	1184M
anti-GQ <sub>1b</sub> IgG	1184G
anti-Galattocerebroside IgM	1185M
anti-Galattocerebroside IgG	1185G
anti-GD <sub>1a</sub> IgM	1186M
anti-GD <sub>1a</sub> IgG	1186G

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> †	<b>Micropiastra</b> con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene purificato. La tipologia dell'antigene è indicata sull'etichetta.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> * †	<b>Calibratore</b> (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-gangliosidi. La concentrazione in EU/ml è indicata sull'etichetta del flaconcino
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL +</b> * †	<b>Controllo Positivo</b> (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per rispettivi anticorpi anti-gangliosidi.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Controllo Negativo</b> (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano negativo per anticorpi anti-ganglioside.
1 x 12 ml	<b>CONJ ALKPHOS</b> * †	<b>Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgM o IgG umane pronto all'uso;</b> di colore rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente siero</b> pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato Enzimatico pronto all'uso.</b> Contiene pNPP. <b>Proteggere dalla luce.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Soluzione di Stop</b> pronta all'uso.
2 x	<b>BUF WASH</b>	<b>Tampone di Lavaggio</b> in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

\* Contiene < 0,1% NaN<sub>3</sub>

? L'antigene specifico della piastra e l'anticorpo/isotipo per ciascun kit di questa famiglia di prodotti sono indicati sotto:

**REF** 1180M contiene micropiastra per GM<sub>1</sub>, calibratore e controllo per coniugato GM<sub>1</sub> IgM e IgM

**REF** 1180G contiene micropiastra per GM<sub>1</sub>, calibratore e controllo per coniugato GM<sub>1</sub> IgG e IgG

**REF** 1181M contiene micropiastra per Asialo GM<sub>1</sub>, calibratore e controllo per coniugato Asialo GM<sub>1</sub> IgM e IgM

IT

**REF** 1181G contiene micropiastra per Asialo GM<sub>1</sub>, calibratore e controllo per coniugato Asialo GM<sub>1</sub> IgG e IgG

**REF** 1183M contiene micropiastra per GD<sub>1b</sub>, calibratore e controllo per coniugato GD<sub>1b</sub> IgM e IgM

**REF** 1183G contiene micropiastra per GD<sub>1b</sub>, calibratore e controllo per coniugato GD<sub>1b</sub> IgG e IgG

**REF** 1184M contiene micropiastra per GQ<sub>1b</sub>, calibratore e controllo per coniugato GQ<sub>1b</sub> IgM e IgM

**REF** 1184G contiene micropiastra per GQ<sub>1b</sub>, calibratore e controllo per coniugato GQ<sub>1b</sub> IgG e IgG

**REF** 1185M contiene micropiastra per Galattocerebroside, calibratore e controllo per coniugato Galattocerebroside IgM e IgM

**REF** 1185G contiene micropiastra per Galattocerebroside, calibratore e controllo per coniugato per Galattocerebroside IgG e IgG

**REF** 1186M contiene micropiastra per GD<sub>1a</sub>, calibratore e controllo per coniugato GD<sub>1a</sub> IgM e IgM


**REF** 1186G contiene micropiastra per GD<sub>1a</sub>, calibratore e controllo per coniugato GD<sub>1a</sub> IgG e IgG


#### **Simboli usati sulle etichette:**

**LOT** Numero di lotto

**REF** Numero catalogo

 Scadenza

 Temperatura di conservazione

 Leggere le istruzioni per l'uso

**IVD** Uso diagnostico in vitro

 Produttore

 Numero di test

#### **Materiali necessari ma non forniti**

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

#### **RACCOLTA DEL CAMPIONE**

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati a -20°C. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

## PROCEDURA

### Note sul test

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Togliere i pozzetti necessari dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.
- **Portare il substrato enzimatico a temperatura ambiente prima dell'uso. Tutti i reagenti, incluso il tampone di lavaggio devono essere mantenuti a 2-8°C e usati refrigerati.** Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Diluire il campione del paziente immediatamente prima di iniziare l'analisi e conservare le diluizioni a 2-8°C fino al momento dell'uso.
- Preparare il tampone di lavaggio e portarlo a una temperatura di 2-8°C. Il tampone di lavaggio non può essere preparato durante l'esecuzione dell'analisi.
- **Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.** Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio refrigerato, con un flacone a punta larga, su tutti i pozzetti. Tuttavia, per questa analisi non è consigliato il lavaggio manuale.
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e i tempi di incubazione più uniformi.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. La dispensazione di tutti i campioni e reagenti deve essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza e tutti i periodi di incubazione devono iniziare con il completamento dell'aggiunta dei reagenti. Ciascun periodo di incubazione deve essere misurato indipendentemente dal precedente.

### Metodo del test

- Fase 1** Mantenere la temperatura di tutti i reagenti (ad eccezione del Substrato Enzimatico) e la piastra per microtitolo tra 2-8°C fino alla fase 11 dell'analisi.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti secondo la figura che segue. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Fase 3** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **500 µl** di Diluente del Siero **refrigerato**.
- Fase 4** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta **refrigerata** e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.  
**Nota:** Durante l'esecuzione delle fasi da 1 a 5, i pozzetti possono essere posizionati su sacche di ghiaccio per mantenerli ad una temperatura di 2-8°C.  
**Nota:** Pipettare **100 µl** di Diluente del Siero **refrigerato** in un pozzetto come bianco. Tutte le fasi devono essere eseguite con cura per evitare il riscaldamento dei pozzetti e delle diluizioni del siero.
- Fase 5** Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo nei pozzetti. Pipettare **100 µl** di campioni diluiti refrigerati.

DETERMINAZIONE QUALITATIVA:

A	BLANK	S5	○	○
B	NEG	S6	○	○
C	POS	S7	○	○
D	CAL	S8	○	○
E	S1	S9	○	○
F	S2	S10	○	○
G	S3	S11	○	○
H	S4	S12	○	○
			1	2 3 4

IT

- Fase 6** Incubare per 16-18 ore da 2-8°C.
- Fase 7** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Aspirare i contenuti di ciascun pozzetto. Capovolgere la piastra e batterla delicatamente su carta assorbente. Tenerla capovolta per 1 minuto per eliminare tutto il liquido dai pozzetti. **Nota: Non battere con forza, ma delicatamente per rimuovere l'eccesso di liquido dai pozzetti. Mantenere le strisce refrigerate durante questa operazione.**
- Fase 8** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 9** Incubare per 2 ore a 2-8°C.
- Fase 10** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 7.
- Fase 11** Pipettare **100 µl** di **Substrato Enzimatico portato a temperatura ambiente** in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 12** Incubare per **30 minuti** ( $\pm$  5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 13** Pipettare **100 µl** di Soluzione di Stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Fase 14** Azzerare il lettore ELISA contro il bianco. Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630 nm).

#### Controllo di Qualità

Il bianco deve essere eseguito per ciascuna analisi per verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere  $<0,3$ . Le EU/ml del Controllo Positivo dovrebbero rientrare nell'intervallo indicato sull'etichetta. Il controllo negativo deve essere inferiore  $<20$  EU/ml. La densità ottica del calibratore deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore dell'assorbanza del controllo positivo. Per una migliore riproducibilità, i campioni possono essere analizzati in duplicato e le EU/ml calcolate usando la media delle letture dell'assorbanza per i pozzetti in duplicato.

#### RISULTATI

##### Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

##### 1. QUALITATIVO

I risultati ottenuti con questo metodo dovrebbero essere riportati come positivi o negativi.

##### Assorbanza del campione del test

----- X EU/ml di Calibratore D = EU/ml del Campione

##### Assorbanza del calibratore

##### Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali che possono variare in base alla popolazione esaminata.

##### Valore Anti-Ganglioside Interpretazione

$< 20$ EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminato (Borderline)
$>25$ EU/ml	Positivo

##### 2. Quantitativo

I valori quantitativi dei campioni positivi possono essere determinati con il metodo qualitativo. Questi valori dovrebbero essere espressi come titolo del campione<sup>14</sup>. Per determinare il titolo dei pazienti positivi, eseguire

IT

diluizioni seriali quaduple dei campioni a partire da 1:101 ed eseguire l'analisi secondo le modalità indicata per il test. L'ultima diluizione che ha un valore EU/ml superiore a 25 rappresenta il titolo endpoint del campione del paziente. Sotto viene fornita una Tabella che mostra la preparazione adeguata delle serie di diluizioni x 4.

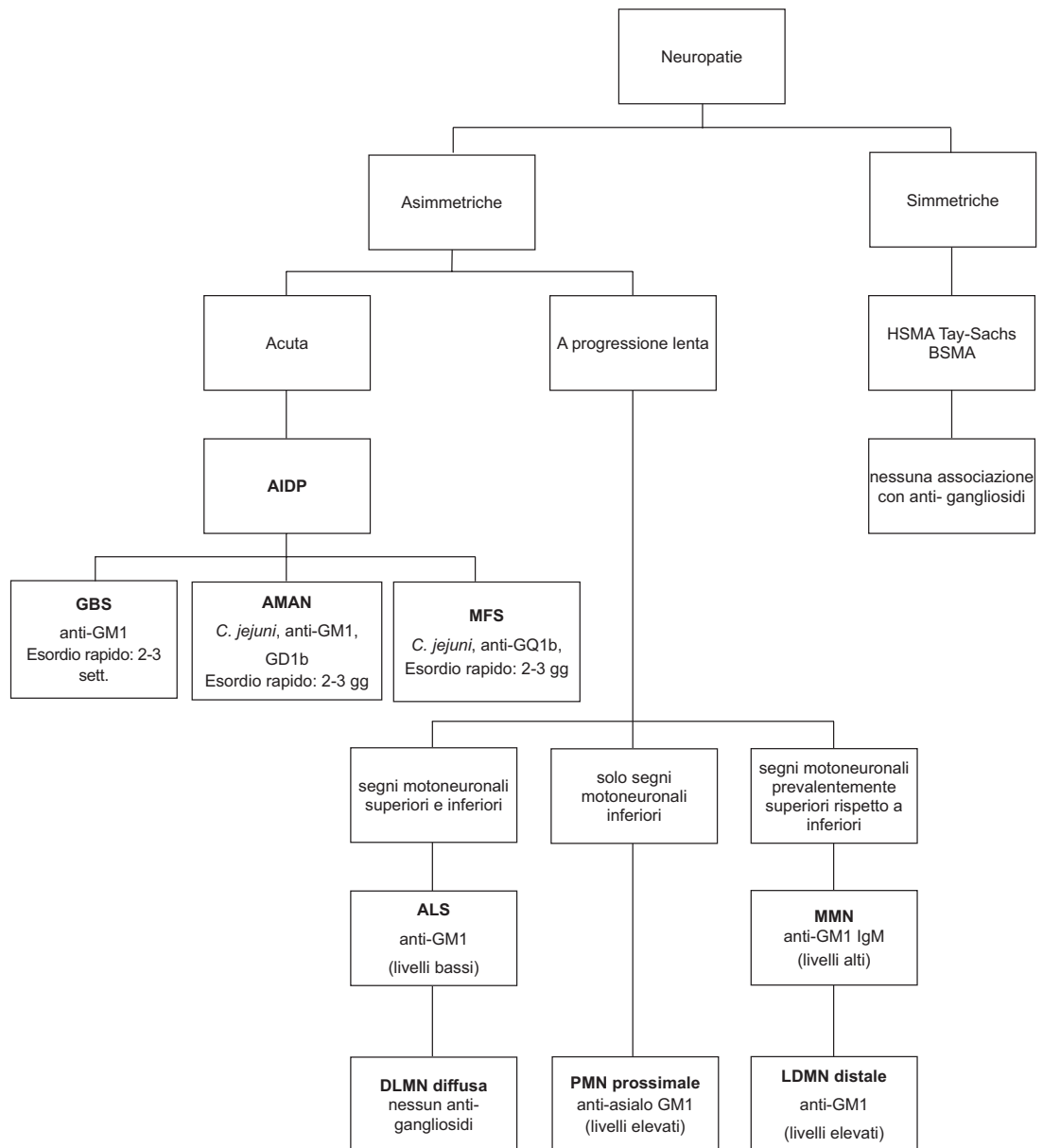
<b>Provette</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Siero</b>	10 µl			
	+			
<b>Diluyente</b>	1000 µl	800 µl	800 µl	800 µl
<b>Tamponato</b>		↻	↻	↻
<b>Trasferimento</b>	200 µl	200 µl	200 µl	
<b>Diluizione finale</b>	1:100	~1:400	~1:1600	~1:6400

### LIMITAZIONI DEL TEST

I risultati di quest'analisi, presi singolarmente, non hanno valenza diagnostica e dovrebbero essere considerati in congiunzione con le evidenze cliniche del paziente. I risultati borderline dovrebbero essere testati nuovamente per confermare i risultati. Si raccomanda inoltre che i pazienti con risultati borderline vengano testati a intervalli appropriati. La terapia immunosoppressiva, la plasmaferesi, l'inizio o l'alterazione del trattamento del paziente con neuropatia non dovrebbero essere intrapresi unicamente sulla base di una reazione positiva in quest'analisi. Ogni osservazione clinica e, più importante, dati elettrofisiologici quali l'arresto della conduzione motoria nervosa e altri sintomi collegati dovrebbero essere considerati insieme ai risultati ottenuti dall'analisi dei gangliosidi. Il siero di alcuni pazienti con neuropatie può essere negativo per certi gangliosidi. Questi pazienti dovrebbero essere analizzati per anticorpi diretti contro altri gangliosidi.

### VALORI ATTESI

Il seguente diagramma di flusso illustra la presenza di anticorpi anti-gangliosidi in certe neuropatie ben caratterizzate<sup>1,7</sup>. Il diagramma è inteso come strumento di aiuto nella diagnosi differenziale e non dovrebbe essere usato come un'informazione conclusiva per le neuropatie elencate. Vedere limiti della procedura.



### Legenda

GBS	=	Sindrome Guillain-Barré
AMAN	=	Neuropatia Moto-Assonale Acuta
MFS	=	Sindrome Miller-Fisher
ALS	=	Sclerosi Laterale Amiotrofica
MMN	=	Neuropatia Moto-Multifocale
HSMA	=	Atrofia Muscolare Spinale Ereditaria
LDMN	=	Sindrome Neuronale Motoria Distale Inferiore
PMN	=	Sindrome Neuronale Motoria Prossimale
DLMN	=	Sindrome Neuronale Motoria Inferiore Diffusa
AIDP	=	Polineuropatia Demielinante Infiammatoria Acuta



# ELISA para anticorpos anti-gangliósidos

IVD

## FOLHETO DO PRODUTO

<b>REF</b>	1180M IgM anti-GM <sub>1</sub> 96 determinações
<b>REF</b>	1180G IgG anti-GM <sub>1</sub> 96 determinações
<b>REF</b>	1181M IgM anti-Asialo GM <sub>1</sub> 96 determinações
<b>REF</b>	1181G IgG anti-Asialo GM <sub>1</sub> 96 determinações
<b>REF</b>	1183M IgM anti-GD <sub>1b</sub> 96 determinações
<b>REF</b>	1183G IgG anti-GD <sub>1b</sub> 96 determinações
<b>REF</b>	1184M IgM anti-GQ <sub>1b</sub> 96 determinações
<b>REF</b>	1184G IgG anti-GQ <sub>1b</sub> 96 determinações
<b>REF</b>	1185M IgM anti-Galactocerebrósido 96 determinações
<b>REF</b>	1185G IgG anti-Galactocerebrósido 96 determinações
<b>REF</b>	1186M IgM anti-GD <sub>1a</sub> 96 determinações
<b>REF</b>	1186G IgG anti-GD <sub>1a</sub> 96 determinações

## APLICAÇÃO

Estes ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) estão indicados para detecção e semiquantificação de anticorpos contra *gangliósidos* em soro humano como auxiliares nas indicações clínicas de doentes com doenças que afectem os neurónios motores — neuropatias.

## RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os *gangliósidos* são *glicoesfingolípido*s ácidos existentes na camada externa das membranas plasmáticas, que ocorrem em diversas *doenças dos neurónios motores ou neuropatias*. *Regra geral*, as *neuropatias* podem ser debilitantes e, caso afectem o funcionamento de órgãos vitais, podem ser fatais. Podem ser hereditárias, provocadas por infecção ou doença auto-imune e podem ter sintomas semelhantes, o que dificulta o diagnóstico. O diagnóstico exacto é importante, uma vez que o prognóstico e o tipo de tratamento podem ser diferentes<sup>1</sup>.

A caracterização de algumas neuropatias, em particular a síndrome de Guillain-Barré (SGB), é melhor do que de outras. A síndrome de Guillain-Barré refere-se a uma doença auto-imune que se caracteriza por fraqueza rápida dos membros, perda de reflexos tendinosos e disfunções sensoriais. É uma neuropatia inflamatória aguda. Nos doentes com esta síndrome pode desencadear-se uma resposta de anticorpos contra gangliósidos GM<sub>1</sub><sup>2,3</sup>. Estes anticorpos são relatados em doentes com lesões axonais graves e mau prognóstico, e podem ser dirigidos directamente contra a *estrutura de galactose-galactosamina* da fracção de hidratos de carbono da molécula<sup>4</sup>. A síndrome de Guillain-Barré é uma doença auto-imune que ocorre, tipicamente, em períodos pós-infecção. Mais de dois terços de doentes com esta síndrome têm antecedentes de infecção, habitualmente mediada por vírus ou bactérias. O *citomegalovírus* associado a infecções do tracto respiratório superior e o *Campylobacter jejunii* associado a *gastroenterite* iniciam uma resposta imunitária de reactividade cruzada contra os gangliósidos, resultando na deposição de complexos imunes e desmielinização de nervos, que conduz à lentidão ou bloqueio da condução nervosa<sup>5</sup>.

GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> e asialo GM<sub>1</sub> partilham os mesmos terminais Gal (β1-3) GalNAc. Verifica-se que co-existem títulos aumentados de anticorpos IgM contra GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> e asialo GM<sub>1</sub> em vários tipos de neuropatias motoras<sup>6</sup>. Entre estes, os anticorpos anti-GM<sub>1</sub> estão preferencialmente associados a neuropatias motoras multifocais e nunca foram observados em doenças dos neurónios motores inferiores<sup>7</sup>. Esta constatação distingue-os dos anticorpos anti-GD<sub>1b</sub> e asialo GM<sub>1</sub>, que são observados preferencialmente em casos de neuropatias motoras inferiores.

Actualmente, têm sido descritos os perfis serológicos e os anticorpos anti-gangliósidos em doentes tratados e não tratados com síndrome de Guillain-Barré<sup>8</sup>. Os títulos de IgM anti-GM<sub>1</sub>, IgG e anti-GD<sub>1a</sub>, IgM atingiram o pico por volta dos quarenta (40) e noventa (90) dias, respectivamente. Os títulos de IgG anti-GM<sub>1</sub> diminuíram após o tratamento intravenoso com imunoglobulinas (Ivlg). A utilidade clínica destes anticorpos é demonstrada na correlação dos picos de anticorpos com resultados de incapacidade mais elevados e piores resultados clínicos<sup>8</sup>. Os anticorpos IgG anti-GD<sub>1a</sub> também são encontrados em 23% dos doentes com esclerose múltipla (EM) e em 18% de doentes com nevrite óptica (NO)<sup>9</sup>. O aumento da resposta de IgG anti-GD<sub>1a</sub> pode ser usado como um factor diferenciador

entre a esclerose múltipla e a síndrome de Guillain-Barré<sup>9</sup>. Estudos imunopatológicos sugerem que o alvo do ataque imunitário é diferente nos diversos subtipos da síndrome de Guillain-Barré. Na neuropatia axonal motora aguda, o ataque é dirigido directamente contra o axolema e os nódulos de Ranvier. Os anticorpos anti-GD<sub>1a</sub> ligam-se selectivamente aos nós dos nervos motores e não aos nervos sensitivos dos nós de Ranvier, o que sugere o seu papel patogénico<sup>10</sup>.

Os anticorpos anti-GM<sub>1</sub> e anti-GD<sub>1b</sub> foram igualmente descritos em doentes com esclerose múltipla (EM), lúpus eritematoso sistémico, doença de Alzheimer e em alguns indivíduos normais. É importante salientar que os anticorpos anti-GM<sub>1</sub> e anticorpos relacionados com títulos superiores a 1:800 estão fortemente associados, e de forma específica, a doença dos neurónios motores inferiores, neuropatia motora-sensorial e neuropatia motora<sup>11</sup>.

As respostas auto-imunes em doentes que sofrem de outras *neuropatias* podem ser dirigidas contra GQ<sub>1b</sub> e gangliósidos sulfatides<sup>7</sup>. Os anticorpos GQ<sub>1b</sub> estão associados à síndrome de Miller Fisher, uma variante involgar da síndrome de Guillain-Barré, que provoca *oftalmoplegia*, *ataxia* e *arreflexia* e ocorre muitas vezes após um episódio infeccioso. Os anticorpos anti-galactocerebrósidos parecem estar relacionados de perto com anticorpos anti-sulfatides e foram observados em doentes com *nevrite leprosa*, *tripanossomiase africana* e *leishmaniose muco-cutânea*.

Os anticorpos anti-gangliósidos pertencem normalmente aos isotipos IgM e/ou IgG. Foi demonstrado que a filtração do plasma é uma medida terapêutica eficaz desde que seja iniciada não depois de terem decorrido duas semanas após o início dos sintomas<sup>12</sup>. Por este motivo, os testes laboratoriais que se baseiem na detecção precoce de anticorpos contra vários gangliósidos podem complementar eficazmente estas terapêuticas.

## PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Os ensaios de anticorpos anti-gangliósidos ImmuLisa™ são efectuados como ensaios de imunoabsorção enzimática de fase sólida (ELISA). Os micropoços revestidos com antigénio purificado são utilizados para incubar os controlos, calibradores e amostras de soro de doentes diluídas para permitir a ligação de anticorpos específicos presentes ao respectivo antigénio. Os anticorpos não ligados e outras proteínas séricas são removidos por lavagem dos micropoços. Após a adição e incubação com um conjugado anti-humano marcado com enzima, o conjugado não ligado é removido por lavagem dos micropoços. A adição de um substrato enzimático específico (pNPP) aos micropoços resulta numa mudança de cor produzida pela conversão do substrato num produto de reacção amarelo. A reacção é parada e é lida a intensidade da mudança de cor, proporcional à concentração de anticorpos, por um espectrofotómetro a 405 nm. O valor da concentração de anticorpos é expresso em unidades ELISA por mililitro (UE/ml) no calibrador e controlo positivo. Estes valores são usados para determinar a conformidade com os controlos de qualidade do ensaio e para determinar resultados qualitativos. Os resultados de amostras positivas devem ser expressos sob a forma de título.

## REAGENTES

### Conservação e preparação

Conserve todos os reagentes a uma temperatura entre 2 e 8 °C. **Não congele.** Não utilize se o reagente não estiver límpido ou se existir algum precipitado. **Todos os reagentes têm de ser conservados entre 2 e 8 °C durante toda a utilização**, excepto o substrato enzimático, que tem de estar à temperatura ambiente (20–25 °C) antes de ser utilizado. Desde que conservado a uma temperatura entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído mantém-se estável até ao fim do prazo de validade do kit.

### Precauções

Todos os componentes obtidos a partir de seres humanos foram testados relativamente à presença de HBsAg, VHC, VIH-1, VIH-2 e HTLV-I, tendo-se obtido resultados negativos em testes exigidos pela FDA. Porém, os derivados de sangue humano e as amostras de doentes devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Siga as boas práticas de laboratório em relação à conservação, distribuição e eliminação destes materiais<sup>13</sup>. **ADVERTÊNCIA** — A azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) pode reagir com a canalização de cobre e chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Elimine os líquidos com um grande volume de água para impedir a acumulação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica por ingestão. Em caso de ingestão, avise imediatamente o director do laboratório ou o centro anti-venenos.

PT

**Para garantir resultados válidos deve seguir-se com rigor as instruções descritas neste folheto informativo do kit.** Não troque componentes do kit com componentes de outras origens. Caso necessite de outros reagentes, utilize apenas componentes com o mesmo número de lote da Immco Diagnostics Inc. Siga as boas práticas de laboratório para minimizar a contaminação microbiana e a contaminação cruzada dos reagentes durante o manuseamento. Não utilize após o fim do prazo de validade.

#### Materiais fornecidos

Produto	REF
ImmuLisa™ IgM anti-GM <sub>1</sub>	1180M
ImmuLisa™ IgG anti-GM <sub>1</sub>	1180G
ImmuLisa™ IgM anti-Asialo GM <sub>1</sub>	1181M
ImmuLisa™ IgG anti-Asialo GM <sub>1</sub>	1181G
ImmuLisa™ IgM anti-GD <sub>1b</sub>	1183M
ImmuLisa™ IgG anti-GD <sub>1b</sub>	1183G
ImmuLisa™ IgM anti-GQ <sub>1b</sub>	1184M
ImmuLisa™ IgG anti-GQ <sub>1b</sub>	1184G
ImmuLisa™ IgM anti-Galactocerebrósido	1185M
ImmuLisa™ IgG anti-Galactocerebrósido	1185G
ImmuLisa™ IgM anti-GD <sub>1a</sub>	1186M
ImmuLisa™ anti-GD <sub>1a</sub> IgG	1186G

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> †	<b>Microplaca</b> com micropoços individuais destacáveis revestidos com antígeno purificado. O antígeno gangliósido é indicado no rótulo.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> * †	<b>Calibrador pronto a usar</b> ( <i>tampa verde</i> ). Derivado de soro humano contendo anticorpos contra os respectivos gangliósidos. A concentração em UE/ml está impressa no rótulo do frasco.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL +</b> * †	<b>Controlo positivo pronto a usar</b> ( <i>tampa vermelha</i> ). Contém soro humano para o respectivo anticorpo anti-gangliósido.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Controlo negativo pronto a usar</b> ( <i>tampa branca</i> ). Contém soro humano negativo para anticorpo anti-gangliósido.
1 x 12 ml	<b>CONJ ALKPHOS</b> * †	<b>Conjugado de IgG ou IgM anti-humana com fosfatase alcalina</b> pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente de soro</b> pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato enzimático</b> pronto a usar. Contém pNPP. <b>Proteger da luz.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solução de paragem</b> pronta a usar.
2 x	<b>BUF WASH</b>	<b>Tampão de lavagem em pó.</b> Reconstituir cada unidade em um litro.






\*Contém < 0,1% NaN<sub>3</sub>

† O antígeno e anticorpo/isótipo da microplaca específicos de cada kit nesta família de produtos são indicados a seguir:

PT

- REF** 1180M contém microplaca para GM<sub>1</sub>, calibrador e controlo para IgM anti-GM<sub>1</sub> e conjugado de IgM
- REF** 1180G contém microplaca para GM<sub>1</sub>, calibrador e controlo para IgG anti-IGM<sub>1</sub> e conjugado de IgG
- REF** 1181M contém microplaca para Asialo GM<sub>1</sub>, calibrador e controlo para IgM anti-Asialo GM<sub>1</sub> e conjugado de IgM
- REF** 1181G contém microplaca para Asialo GM<sub>1</sub>, calibrador e controlo para IgG anti-Asialo GM<sub>1</sub> e conjugado de IgG
- REF** 1183M contém microplaca para GD<sub>1b</sub>, calibrador e controlo para IgM anti-GD<sub>1b</sub> e conjugado de IgM
- REF** 1183G contém microplaca para GD<sub>1b</sub>, calibrador e controlo para IgG anti-GD<sub>1b</sub> e conjugado de IgG
- REF** 1184M contém microplaca para GQ<sub>1b</sub>, calibrador e controlo para IgM anti-GQ<sub>1b</sub> e conjugado de IgM
- REF** 1184G contém microplaca para GQ<sub>1b</sub>, calibrador e controlo para IgG anti-GQ<sub>1b</sub> e conjugado de IgG
- REF** 1185M contém microplaca para galactocerebrósido, calibrador e controlo para IgM anti-galactocerebrósido e conjugado de IgM
- REF** 1185G contém microplaca para galactocerebrósido, calibrador e controlo para IgG anti-galactocerebrósido e conjugado de IgG
- REF** 1186M contém microplaca para GD<sub>1a</sub>, calibrador e controlo para IgM anti-GD<sub>1a</sub> e conjugado de IgM
- REF** 1186G contém microplaca para GD<sub>1a</sub>, calibrador e controlo para IgG anti-GD<sub>1a</sub> e conjugado de IgG

#### **Símbolos utilizados nos rótulos:**

- LOT** Número de lote
- REF** Número de catálogo
-  Prazo de validade
-  Temperatura de armazenamento
-  Ler as instruções de utilização
- IVD** Utilização em diagnóstico in vitro
-  Fabricante
-  Número de testes

#### **Materiais necessários mas não fornecidos**

- Água destilada ou desionizada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade para distribuir 5 a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio de 12 x 75 mm, limpos, e respectivo suporte
- Temporizador
- Papel absorvente
- Leitor de microplacas com capacidade para leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas com duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600–650 nm.
- Dispositivo automático de lavagem de micropipetas com capacidade para distribuir 200 µl

## COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só devem ser utilizadas amostras de soro. Amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com contaminação microbiana podem interferir com o desempenho do teste e não devem ser utilizadas. Conserve as amostras a uma temperatura entre 2 e 8 °C durante um período não superior a uma semana. Para um armazenamento mais prolongado, as amostras de soro devem ser congeladas a -20 °C. Evite ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras.

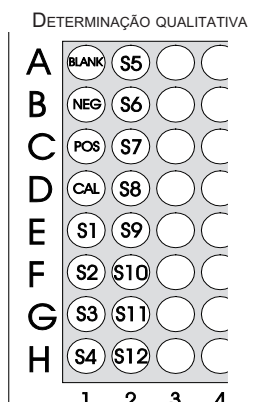
## PROCEDIMENTO

### Notas sobre o procedimento

- Lei atentamente o folheto informativo do produto antes de começar o ensaio.
- Retire da bolsa as tiras de micropoços necessárias e, para evitar a condensação, volte a colocar imediatamente no frigorífico os micropoços não usados na bolsa selada.
- **Deixe o substrato enzimático atingir a temperatura ambiente antes de o utilizar. Todos os outros reagentes, incluindo o tampão de lavagem, devem ser mantidos a uma temperatura entre 2 e 8 °C e utilizados frios.** Imediatamente após a utilização, volte a colocar as amostras e os reagentes não usados no frigorífico.
- Dilua as amostras dos doentes imediatamente antes de iniciar o ensaio e conserve as diluições entre 2 e 8 °C até ao momento de utilização.
- Prepare o tampão de lavagem e deixe-o atingir a temperatura de 2–8 °C. O tampão de lavagem não pode ser preparado imediatamente antes da execução do ensaio.
- **Uma boa técnica de lavagem é fundamental; recomenda-se a utilização de um dispositivo automático de lavagem de microplacas.** Se a lavagem for feita manualmente deverá usar um frasco de lavagem de boca larga para aplicar um jacto enérgico de tampão de lavagem **frio** em todos os micropoços. Todavia, a lavagem manual não é recomendada para este ensaio.
- Utilize uma pipeta multicanal com capacidade para distribuir em simultâneo para uma tira de 8 poços. Isto acelera o processo e permite um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante controlar cuidadosamente o tempo. A pipetagem de todas as amostras e reagentes deve ser feita à mesma velocidade e na mesma sequência, e o momento de início de todas as incubações deve ter início após o fim da adição de reagentes. Cada período de incubação deve ser cronometrado independentemente do anterior.

## PROCEDIMENTO DE ENSAIO

- Passo 1** Mantenha todos os reagentes (excepto o substrato enzimático) e as tiras de placas de microtitulação à temperatura de 2–8 °C até ao passo 11 do ensaio.
- Passo 2** Indique na folha do protocolo a posição das amostras nos micropoços de acordo com a seguinte figura. Faz parte das boas práticas de laboratório executar os testes das amostras em duplicado.
- Passo 3** Prepare uma diluição a **1:101** da amostra do doente misturando **5 µl** de amostra do doente com **500 µl** de diluente de soro **frio**.
- Passo 4** Retire da bolsa **fria** os micropoços necessários e volte a colocar as tiras não usadas na bolsa selada dentro do frigorífico. Coloque as tiras de micropoços em segurança no suporte extra fornecido.  
**Nota:** enquanto executa os passos 1 a 5, a microplaca deve ser mantida sobre embalagens de gelo para manter uma temperatura de 2–8 °C.  
**Nota:** pipete **100 µl** de diluente de soro **frio** para um micropoço como um branco de reagente. Todos os passos devem ser executados rapidamente para evitar o aquecimento dos micropoços e das diluições do soro.
- Passo 5** Pipete **100 µl** de calibrador, controlos negativo e positivo **frios** para os micropoços. Pipete **100 µl** das amostras diluídas **frias**.



- Passo 6** Incube **16–18 h** (de um dia para o outro) a uma temperatura de 2–8 °C.
- Passo 7** Lave **4x** com tampão de lavagem **frio**. Para a lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Aspire o conteúdo de cada poço. Inverta a microplaca e bata ligeiramente com a microplaca sobre papel absorvente. Mantenha-a invertida durante ~1 min para remover qualquer resíduo de líquido dos micropoços. **Nota: não bata com força, mas apenas ligeiramente para remover o excesso de líquido dos poços. Mantenha todas as tiras frias durante esta operação.**
- Passo 8** Pipete **100 µl** de conjugado **frio** para cada poço.
- Passo 9** Incube durante 2 h a uma temperatura de 2–8 °C.
- Passo 10** Lave todos os micropoços como no passo 7.
- Passo 11** Pipete **100 µl** de **substrato enzimático à temperatura ambiente** para cada poço, na mesma sequência e tempo usados para o conjugado.
- Passo 12** Incube durante **30 min** ( $\pm$  5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 13** Pipete **100 µl** de solução de paragem para cada poço usando a mesma sequência e tempos usados para o substrato enzimático. Leia os valores da absorvância no prazo de uma hora após a adição da solução de paragem.
- Passo 14** Ponha o leitor de ELISA a zero por comparação com o branco de reagente. Leia a absorvância de cada poço a **405 nm** usando um leitor de microplacas de comprimento de onda único ou duplo a 405/603 nm.

### Controlo de qualidade

Para cada ensaio realizado é necessário executar o branco de reagente para confirmação da integridade e exactidão do teste. A leitura de absorvância do branco de reagente deve ser  $< 0,3$ . As UE/ml do controlo positivo devem situar-se no intervalo indicado no rótulo. O controlo negativo tem de ser  $< 20$  UE/ml. O calibrador tem de ter uma leitura de absorvância superior à do controlo negativo e inferior à do controlo positivo. Para melhorar a reprodutibilidade, as amostras podem ser analisadas em duplicado sendo as UE/ml calculadas usando a média das leituras de absorvância dos poços duplicados.

### RESULTADOS

#### Cálculos

As concentrações das amostras de doentes podem ser determinadas por um de dois métodos:

#### 1. QUALITATIVOS

**Os resultados obtidos com este método devem ser apresentados como negativos ou positivos.**

PT

### Absorv. da amostra de teste

————— X UE/ml do calibrador D = UE/ml da amostra de teste

### Absorv. do calibrador D

### Interpretação

A informação a seguir indicada constitui apenas um guia para interpretação dos resultados laboratoriais. Cada laboratório deve determinar os seus valores normais, que podem variar com a população examinada.

Valores de anticorpos	Interpretação anti-gangliósido
< 20 UE/ml	Neg. (-)
20–25 UE/ml	Indeterminado
> 25 UE/ml	Pos. (+)

## 2. QUANTITATIVOS

Podem ser determinados os valores quantitativos para as amostras que tenham resultados positivos no método qualitativos. Os valores quantitativos para as amostras positivas devem ser expressos sob a forma de título.<sup>14</sup> Para determinar o título dos doentes positivos, faça diluições seriadas de quatro vezes da amostra doente começando em 1:101 e execute o ensaio conforme indicado no método de teste. A última diluição que tiver um valor de UE/ml maior que 25 corresponde ao título final do doente. A tabela seguinte indica a preparação correcta das diluições seriadas de quatro vezes.

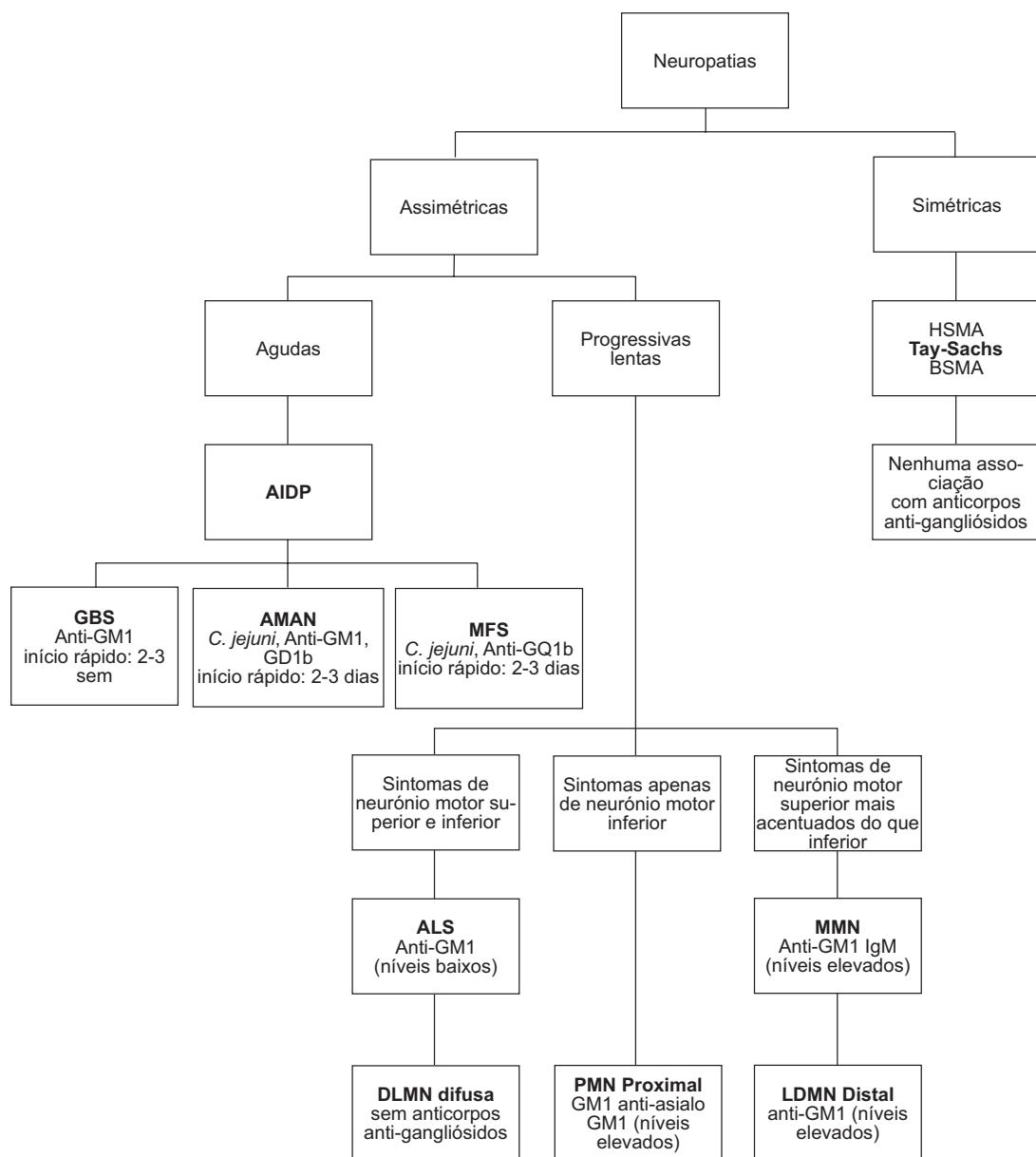
Tubos	1	2	3	4
Soro	10 µl			
	+			
Diluyente do soro	1000 µl	800 µl	800 µl	800 µl
		↗	↗	↗
Transferência	200 µl	200 µl	200 µl	
Diluição final	1:100	~1:400	~1:1600	~1:6400

### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Os resultados dos testes obtidos somente com este ensaio não constituem um diagnóstico e devem ser considerados em conjunto com o quadro clínico do doente. Qualquer teste com reactividade limiar deve ser repetido para confirmação do resultado. Recomenda-se igualmente que os doentes com resultados limiares sejam novamente testados em intervalos adequados. A terapia imunossupressora, plasmaférese, início ou alteração do tratamento de um doente com neuropatia não devem ser feitos com base na reacção positiva a este ensaio. Deve ter-se em consideração todas as outras observações clínicas e, o mais importante, os dados electrofisiológicos como o bloqueio da condução nervosa ou outros sintomas relacionados. O soro de alguns doentes com neuropatias motoras pode ser negativo para determinados gangliósidos. Em tais doentes devem ser feitos testes para auto-anticorpos para outros gangliósidos.

### VALORES ESPERADOS

O fluxograma seguinte representa a presença de anticorpos anti-gangliósidos em determinadas *neuropatias bem caracterizadas*<sup>1,7</sup>. Este fluxograma destina-se apenas a ajudar no diagnóstico diferencial e não deve ser usado como informação conclusiva de todas as neuropatias listadas. **Consulte as limitações do procedimento.**



### Legenda

- GBS = Síndrome de Guillain-Barré
- AMAN = Neuropatia axonal motora aguda
- MFS = Síndrome de Miller-Fisher
- ALS = Esclerose lateral amiotrófica
- MMN = Neuropatia motora multifocal
- HSMA = Atrofia muscular espinal hereditária
- LDMN = Síndrome do neurónio motor distal inferior
- PMN = Síndrome do neurónio motor proximal
- DLMN = Síndrome do neurónio motor inferior difusa
- AIDP = Polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda

## REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Kornberg AJ and Pestronk A. Chronic motor neuropathies: diagnosis, therapy, and pathogenesis. *Ann Neurol.* 1995; 37:543-550.
2. Pestronk A, Corblath DR, Ilyas AA et al. A treatable multifocal motor neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside. *Ann Neurol.* 1988; 24:73-78.
3. Gregson NA, Koblar S and Hughes RAC. Antibodies to gangliosides in Guillain-Barré syndrome: specificity and relationship to clinical features. *Quart Jour Med.* 1993; 86:111-117.
4. Yuki N. Acute relapsing sensory neuropathy associated with IgM antibody against  $\beta$ -series gangliosides containing a  $\text{NaINAc}\beta_1-4$  ( $\text{Gal2-2aNeuAc8-2aNeuAc}$ )  $\beta_1$  configuration. *Neurology.* 1992; 42:686-689.
5. Kornberg AJ and Pestronk A. The clinical and diagnostic role of anti-GM1 antibody testing. *Muscle Nerve.* 1994; 17:100-104.
6. Willison HJ, Hanlon, GO, Paterson G et al. Mechanisms of action of anti-GM1 and anti-GQ1b ganglioside antibodies in Guillain-Barré syndrome. *J Infect Dis.* 1997; 176: 5144-49.
7. Zeballos RS and McPherson RA. Update of autoantibodies in neurologic disease. *Clin Lab Med.* 1992; 12:61-83.
8. DeAngelrs MD, DiMisio A, Lupo S et al. Anti-GD1a antibodies from an acute motor axonal neuropathy patient selectively bind to motor nerve fiber nodes of Ranvier. *J Neuroimmunol.* 2001; 121: 79-82.
9. Press R, Mata S, Lolli F et al. Temporal profile of anti-ganglioside antibodies and their relation to clinical parameters and treatment of Guillan-Barre syndrome. *J Neurol Sci.* 2001. 190: 41-7.
10. Mata S, Lolli F, Soderstrom M et al. Multiple sclerosis is associated with enhanced B cell responses to the ganglioside  $\text{GD}_{1a}$ . *Mult scler.* 1999. 6: 379-88.
11. Latov N. Neuropathy and anti-GM1 antibodies. *Ann Neurol.* 1990; 27(suppl.): 541-43.
12. Rudnicki S, Vriesendorp F and Mayher RF. Electrophysiology. Studies in the Guillain-Barré syndrome: effects of plasma exchange and antibody rebound. *Muscle Nerve.* 1992; 15:57-62.
13. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health. 1993; (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
14. Kuijff M et al. Diagnostic value of anti-GM1 ganglioside serology and validation of the INCAT-ELISA. *J Neurol Sci.* 2005; 239(1):37-44.





*For technical assistance please contact:*

**IMMCO Diagnostics, Inc.**

**60 Pineview Drive**

**Buffalo, NY 14228-2120**

**Telephone: (716) 691-0091**

**Fax: (716) 691-0466**

**Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST**

**E-Mail: [info@immco.com](mailto:info@immco.com)**

*or your local product distributor*



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rapresentante  
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé  
EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,  
The Netherlands  
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299  
[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)