BÜHLMANN
GanglioCombi® *Light* ELISA

mit Enzymmarkern IgG/IgM Mix, IgG und IgM

Nachweis von anti-Gangliosid Antikörpern mittels ELISA
(GM1, GD1b und GQ1b)

Für den Gebrauch in der *In-vitro*-Diagnostik

EK-GCL-S 96 Tests

Freigabedatum: 2023-08-17
Version A1

Hersteller
BÜHLMANN Laboratories AG
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Schweiz
Tel.: +41 61 487 12 12
Fax: +41 61 487 12 34
info@buhlmannlabs.ch

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA ist ein *in vitro* diagnostischer Assay für die semi-quantitative Bestimmung von IgG- und/oder IgM-Antikörpern gegen ausgewählte neurale Antigene/Epitope in Serumproben. Assay-Ergebnisse können in Verbindung mit anderen klinischen und Laborbefunden die Diagnose von autoimmunen peripheren Neuropathien unterstützen.
Nur für den Laborgebrauch.

ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN

Die drei Enzymmarker in diesem Kit ermöglichen drei verschiedene Testoptionen:

1. Das Testen mit dem IgG/IgM-Konjugatmix (im Folgenden Mix genannt) ermöglicht das Screening auf das Vorhandensein von antineuralen Antikörpern, die auf eine autoimmune Neuropathie hinweisen.
2. Das Testen mit individuellen IgG- und/oder IgM-Konjugaten ermöglicht die Bestimmung von Antikörper-Isotypen.
3. Für die Laboraufarbeitung kann dem ersten Probenscreening mit dem Mix (Option 1) gegebenenfalls eine Differenzierung der positiven Mixproben anhand individueller IgG- und IgM-Konjugate (Option 2) folgen.

TESTPRINZIP

Der BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA ermöglicht das selektive Messen von Gangliosid-Antikörpern in Serum. Die Mikrotiterplatte ist mit Gangliosiden beschichtet: GM1, GD1b und GQ1b.
Zu den Wells der Mikrotiterplatte werden Patientenseren, Kontrollen und Kalibrator hinzugegeben. Nach 2 Stunden Inkubationszeit bei 2 – 8 °C und Waschschritten, weisen mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte Nachweisantikörper (anti-IgG/IgM, anti-IgG, anti-IgM) das anti-Gangliosid nach, das an die immobilisierten Ganglioside auf der Platte gebunden ist. Nach weiteren 2 Stunden Inkubationszeit und weiteren Waschschritten wird das chromogene HRP-Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben (blaue Färbung), gefolgt von einer Stopp-Reaktion (Farbwechsel zu gelb). Die Absorption wird bei 450 nm gemessen.
Die gemessene Absorption ist proportional zum Titer der Antikörper, die in einer gegebenen Probe vorliegen. Antikörpertiter werden als %-Verhältnis des Kalibrators ausgedrückt und können Titerkategorien zugeordnet werden (negativ, Grauzone, positiv).

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenzien	Menge	Code	Rekonstitution
Mikrotiterplatte Beschichtet mit Gangliosiden	12 x 8 Well-Streifen mit Rahmen	B-GCL-MP	Gebrauchsfertig
Abdeckfolie	3 Stück		
Waschpufferkonzentrat (10x) mit Konservierungsstoffen	1 Flasche x 100 mL	B-GCO-WB	Mit 900 mL deionisiertem Wasser verdünnen
Inkubationspuffer mit Konservierungsstoffen	1 Flasche x 100 mL	B-GCO-IB	Gebrauchsfertig
Kalibrator lyophilisiert mit Konservierungsstoffen	1 Fläschchen	B-GCO-CA	1,5 mL Inkubationspuffer hinzugeben
Kontrolle Negativ, Tief und Medium [1] lyophilisiert mit Konservierungsstoffen	3 Fläschchen	B-GCO-CONSET	1,5 mL Inkubationspuffer hinzugeben
Enzymmarker IgG/IgM Mix Anti-Human IgM- und IgG-Antikörper, konjugiert mit HRP, in einer Puffermatrix mit Koservierungsstoffen	1 Fläschchen x 11 mL	B-GCO-ELGM	Gebrauchsfertig
Enzymmarker IgG Anti-Human IgG-Antikörper, konjugiert mit HRP, in einer Puffermatrix mit Koservierungsstoffen	1 Fläschchen x 11 mL	B-GCO-ELG	Gebrauchsfertig
Enzymmarker IgM Anti-Human IgM-Antikörper, konjugiert mit HRP, in einer Puffermatrix mit Koservierungsstoffen	1 Fläschchen x 11 mL	B-GCO-ELM	Gebrauchsfertig
TMB-Substrat TMB in Citratpuffer	1 Fläschchen x 11 mL	B-TMB	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0,25 M Schwefelsäure	1 Fläschchen x 11 mL	B-STS	Gebrauchsfertig **korrosives Agens**

Tabelle 1

[1] Die Kontrollen enthalten chargenspezifische Mengen anti-GM1-Antikörper. Die tatsächliche mittlere OD und das %-Verhältnis sind dem zusätzlichen Datenblatt zur Qualitätskontrolle zu entnehmen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Verschlossene/ ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8 °C lagern. Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf den Etiketten aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwendet werden.	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Mikrotiterplatte	Ungebrauchte Streifen sofort in den Folienbeutel mit den Trockenmittelpackungen zurücklegen und den Druckleistenverschluss entlang der ganzen Breite wieder verschliessen. Bis zu 6 Monate bei 2-8 °C lagern.
Verdünnter Waschpuffer	Bis zu 6 Monate bei 2-8 °C lagern.
Inkubationspuffer	
Enzymmarker	
TMB-Substrat	
Kalibrator	
Kontrollen	
Stopp-Lösung	Bis zu 6 Monate bei 18-28 °C lagern

Tabelle 1

ERFORDERLICHE NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

- Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen: Pipetten mit 10 µL, 20 µL, 100 µL und 1000 µL
- Polystyrol- oder Polypropyleneinwegröhrchen zur Durchführung der Probenverdünnungen
- 1000 mL-Messzylinder zur Verdünnung des Waschpuffers
- Mikrotiterplattenwaschautomat
- Blottingpapier
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplattenphotometer zur Messung der Absorption bei 450 nm

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

- Der Kalibrator und die Kontrollen in diesem Kit enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Obwohl sie in Tests für HBV, HCV und HIV1/2 negativ waren, müssen die Reagenzien als potenziell infektiös angesehen und nach den Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP) gehandhabt werden. Entsprechende Vorsichtsmassnahmen sind zu treffen.
- Dieses Kit enthält Komponenten, die gemäss Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 klassifiziert sind:
  - Die Stopp-Lösung enthält Schwefelsäure (Konz. 2,5 – 5 %), daher können die Reagenzien Hautreizung (H315) und schwere Augenreizung (H319) verursachen und für Metalle korrosiv sein (H290).
  - Der Kalibrator, die Kontrollen und die Enzymmarker enthalten 2-Methyl-4-isothiazolin-3-on-hydrochlorid (Konz. ≥ 0,0015%), daher können die Reagenzien allergische Hautreaktionen verursachen (H317).
  - Der Inkubationspuffer und der Waschpuffer enthalten Gentamicinsulfat, daher können die Reagenzien eine allergische Hautreaktion verursachen (H317).
- Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten vermeiden. Im Falle eines Kontaktes sofort mit reichlich Wasser spülen, ansonsten kann eine Reizung/ Verätzungen auftreten.
- Die Reagenzien und Chemikalien müssen gemäss den nationalen Richtlinien und Bestimmungen für Biogefährdung als gefährlicher Abfall behandelt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

- Vor der Durchführung des Tests die Anweisungen sorgfältig durchlesen. Die Testleistung wird negativ beeinflusst, wenn Reagenzien falsch verdünnt, verändert oder unter Bedingungen gelagert werden, die nicht denen in dieser Gebrauchsanweisung entsprechen.

ELISA-Verfahren

Temperatur der Reagenzien

- Vorbereitung der Reagenzien bevor Beginn der Testdurchführung. Schritt 3-9: Die in Schritt 3-9 verwendeten Reagenzien müssen kalt sein (2-8 °C) und beim Pipettieren und Waschen kalt gehalten werden. Empfehlung: Den Waschpuffer am Tag vor dem Durchführen des Assays vorbereiten und über Nacht im Kühlschrank aufbewahren.
- Alle Waschschritte mit kaltem (2-8 °C) Waschpuffer durchführen.
- Das TMB-Substrat und die Stopp-Lösung zu Beginn des Assayverfahrens auf Raumtemperatur (18-28 °C) bringen.

Waschschritte

- Die Waschschritte 3, 6 und 9 sind zum Entfernen von Rückständen aus dem Herstellungsprozess und/oder möglicherweise nicht gebundenen Antikörper in den Wells äusserst wichtig.
- Ein Waschautomat im „Plattenmodus“ wird dringend empfohlen, d.h. dass jeder Schritt (Einfüllen / Absaugen) erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor mit dem nächsten Waschschritt fortgefahren wird.
- Nach dem letzten Waschzyklus müssen alle Wells vollständig leer sein.

Substratinkubation

- Schritt 11: Die Mikrotiterplatten während der Inkubation mit dem Substrat schütteln. Je nach Modell des Plattenschüttlers empfehlen wir 400-600 U/min. Die Lösung soll sich in den Wells bewegen, darf jedoch nicht überlaufen.

Kit-Komponenten

- Die Komponenten dürfen nach Ablauf des auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt werden.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu Kontaminationen zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und zwischen den Wells kommt.
- Mikrotiter-Wells dürfen nicht wiederverwendet werden.

PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

Für das Verfahren werden <0,1 mL Blut bzw. <50µL Serum benötigt.

Blut in Venenpunktionsröhrchen ohne Zusatzstoffe sammeln und dabei eine Hämolyse vermeiden. Die Serumaufbereitung gemäss den Anweisungen des Herstellers durchführen. Das Serum dekantieren.

Serumproben können bei 2-8 °C bis zu acht Wochen, bei 28 °C bis zu einer Woche und bei ≤-20 °C 16 Wochen lang aufbewahrt werden. Eingefrorene Proben müssen vor Gebrauch aufgetaut und durch behutsames Schütteln oder Umwenden gründlich gemischt werden.
Wir empfehlen, vor den Einfrieren Aliquoten von Serumproben vorzubereiten, um wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Es gibt zwei Optionen:

(1) Nachweis von Mix-Isotypen (IgG und IgM): in Schritt 7 Enzymmarker-Mix hinzugeben

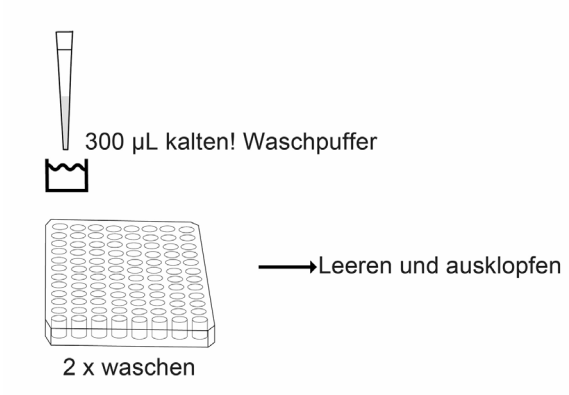
(2) Nachweis von IgG- oder IgM-Isotypen: In Schritt 7 entweder Enzymmarker IgG oder Enzymmarker IgM hinzugeben

Anmerkung: Die TMB-Substratlösung auf Raumtemperatur (18-28 °C) bringen.

1. Die Proben 1:50 mit kaltem! (2-8 °C) Inkubationspuffer verdünnen (z. B. 10 µL Serum + 490 µLInkubationspuffer). Gründlich vortexen und die verdünnten Proben sowie den rekonstituierten Kalibrator und die Kontrollen vor dem Pipettieren 30 Minuten bei 2-8 °C stehen lassen (siehe Schritt 4a und b).
2. Einen Plattenrahmen mit ausreichend Streifen zum Testen der notwendigen Anzahl von Kalibratoren, Kontrollen und Proben vorbereiten. Überzählige Streifen aus dem Rahmen nehmen und sofort wieder zusammen mit den Trockenmittelpackungen im Folienbeutel verschliessen. Gekühlt lagern.

Anmerkung: In Schritt 3 bis 9 kalte Reagenzien verwenden.

3. Die Wells zwei Mal mit mindestens 300 µL kaltem! (2-8 °C) Waschpuffer pro Well waschen. Die Wells leeren und die Platte fest auf Blottingpapier ausklopfen, um verbleibende Flüssigkeit vollständig zu entfernen.



Anmerkung: Sofort zu den nächsten Schritten übergehen.

4a. 100 µL Kalibrator in Well A1 pipettieren (siehe Abbildung 1A für Option 1 oder Abbildung 1B für Option 2).

4b. 100 µL der Kontrolle Medium in Well B1, der Kontrolle Tief in Well A2 und der negativen Kontrolle in Well B2 pipettieren (siehe Abbildung 1A oder 1B).

Anmerkung für Option 1: Wenn mehr als drei Streifen pro Lauf verwendet werden, können die Kalibratoren und Kontrollen zweifach getestet werden (siehe Abbildung 1A).

Anmerkung für Option 2: Der Kalibrator und die Kontrollen sollten für die Isotypen IgG und IgM getrennt durchgeführt werden (siehe Abbildung 1B).

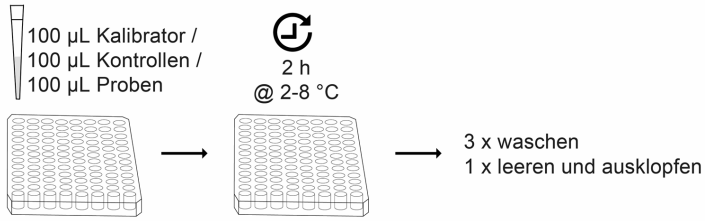
4c. 100 µl der verdünnten Probe 1 in Wells C1-E1 pipettieren (siehe Abbildung 1A oder 1B).

4d. 100 µl der verdünnten Probe 2 in Wells F1-H1 pipettieren (siehe Abbildung 1A oder 1B).

4e. 100 µL der verdünnten Proben 3-24 (für Option 1) oder 3-12 (für Option 2) in die nächsten Wells pipettieren (siehe Abbildung 1A oder 1B).

Anmerkung für Option 2: Das Pipettieren der Proben 1-12 zum Testen mit dem zweiten Isotyp in die verbleibenden Wells in der gleichen Reihenfolge wiederholen.

5. Die Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden (±5 min) bei 2-8 °C inkubieren (die Platte nicht schütteln).
6. Die Abdeckfolie abnehmen. Die Wells leeren und drei Mal mit mindestens 300 µL kaltem! (2-8 °C) Waschpuffer pro Well waschen. Die Wells leeren und die Platte fest auf Blottingpapier ausklopfen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen.



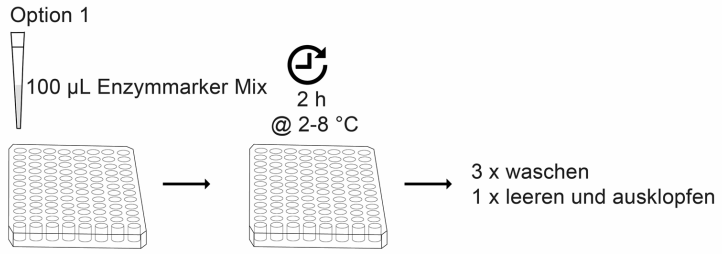
Für Option 1: Nachweis von Mix-Isotyp

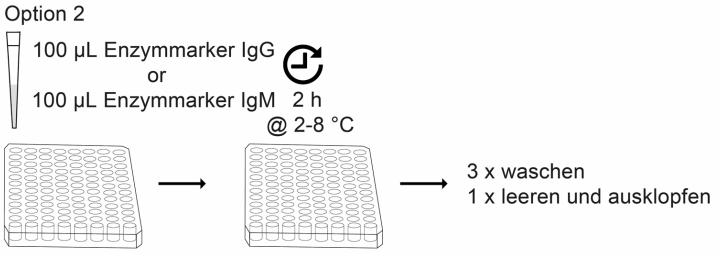
7. 100 µL Mix zu den Wells hinzugeben.

Für Option 2: Nachweis von IgG- oder IgM-Isotypen

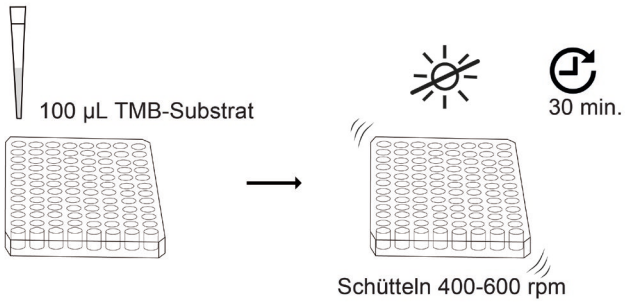
7'. 100 µL entweder Enzymmarker IgG oder IgM zu den jeweiligen Wells hinzugeben (siehe Abbildung 1B).

8. Die Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden (± 5 Minuten) bei 2-8 °C inkubieren (die Platte nicht schütteln).
9. Die Abdeckfolie abnehmen. Die Wells leeren und drei Mal mit mindestens 300 µL kaltem! (2-8 °C) Waschpuffer pro Well waschen. Die Wells leeren und die Platte fest auf Blottingpapier ausklopfen.





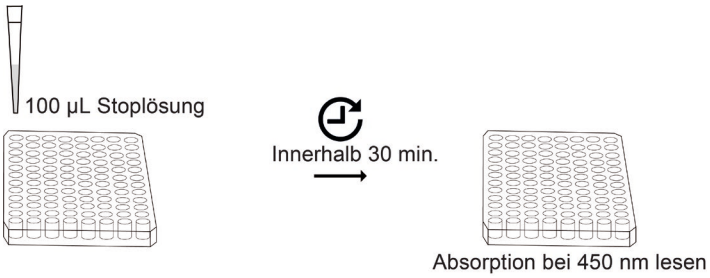
10. 100 µL TMB-Substratlösung (auf Raumtemperatur gebracht) zu jedem Well hinzugeben.
11. Die Platte mit einer Abdeckfolie abdecken, vor Licht schützen und bei 18-28 °C 30 ±2 Minuten auf einem auf 400-600 U/min eingestellten Mikrotiterplatten-Schüttler inkubieren.



12. 100 µL Stopp-Lösung zu jedem Well hinzugeben. Vorhandene Luftbläschen mit einer Pipettenspitze

entfernen. Innerhalb von 30 Minuten zu Schritt 13 übergehen.

13. Absorption in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm messen.



QUALITÄTSKONTROLLE

Für den erfolgreichen Einsatz des Produktes ist eine gründliche Kenntnis der Gebrauchsanweisung notwendig. Zuverlässige Ergebnisse werden nur dann erzielt, wenn präzise Labortechniken verwendet werden, und die Gebrauchsanweisung genau befolgt wird.
Im BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA Kit sind drei Kontrollen enthalten: Kontrolle Negativ, Tief und Medium. Den Kontrollen sind Wertbereiche (% Ratio) zugeordnet, die auf dem QC Datenblatt zu finden sind, das dem Kit beigelegt ist. Gültige Ergebnisse werden nur erreicht, wenn die Kontrollmessungen innerhalb der angegebenen Wertbereiche liegen.
Für den Kalibrator wird ein Mindestwert OD_{450nm} von 1,2 empfohlen.
Die Leistungsmerkmale müssen innerhalb der vorgegebenen Grenzwerte liegen. Falls die Assayleistung den gängigen Grenzwerten nicht entspricht und Verfahrensfehler durch Wiederholung ausgeschlossen wurden, sind die folgenden Faktoren zu prüfen: i) Temperatursteuerung (die in Schritt 3-9 verwendeten Reagenzien wurden bei 2-8 °C gehalten) ii) Genauigkeit der Thermometer sowie Pipettier- und Zeitmessgeräte; iii) Einstellungen des ELISA-Photometers; iv) Verfallsdatum der Reagenzien; v) Lagerungs- und Inkubationsbedingungen; vi) Farbe der TMB-Substratlösung (sollte farblos sein); vii) Wasserreinheit; viii) Absaug- und Waschverfahren.

STANDARDISIERUNG UND MESSTECHNISCHE RÜCKVERFOLGBARKEIT

Für anti-Ganglioside in Serumproben gibt es keine international oder national anerkannten Referenzmaterialien oder Referenz-Messverfahren. Der BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA wird gegen intern erstellte Referenzmaterialien standarisiert. Die Kalibratorwerte werden gemäss einem Werteübertragungsprotokoll (Ref. 1) zugewiesen, um metrologische Rückführbarkeit zu gewährleisten, und werden in beliebigen %-Verhältniseinheiten angegeben.
Das 95%-Konfidenzintervall der kombinierten Unsicherheit von Produktkalibratoren wurde für IgG-Antikörper bei 29,3% und für IgM-Antikörper bei 37,6% festgelegt.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Absorption (OD) für jeden Well (Kalibrator, Kontrollen und Proben) bei 450 nm messen.
2. Falls mehrere Kalibrator- und Kontrollmessungen durchgeführt wurden, den Durchschnitt ermitteln.

Die Ergebnisse werden als Verhältnis der Absorption der Proben zur (durchschnittlichen) Absorption des Kalibrators ausgedrückt.

Mix-Isotypen

$$\text{\%-Verhältnis:} \quad \frac{\text{Absorption von Proben oder Kontrollen}}{\text{Absorption des Kalibrators}} \times 200$$

IgG- und IgM-Isotypen

$$\text{\%-Verhältnis:} \quad \frac{\text{Absorption von Proben oder Kontrollen}}{\text{Absorption des Kalibrators}} \times 100$$

Programme zum Berechnen des %-Verhältnisses sind auf den meisten Mikroplattenphotometern vorhanden.

Anmerkung: Die Ergebnisse in Tabelle 5 und 6 sind Beispiele und dienen nur der Anschauung.

LEISTUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

1. Hohe Ergebnisse des %-Verhältnisses (> 100%) für einzelne Ganglioside können zu Kreuzreaktivität mit anderen Gangliosiden in der gleichen Probe führen. Die Kreuzreaktivität weist gewöhnlich eine hohe Variation zwischen den Assays auf. Die Auslegung der Ergebnisse müssen daher nur zusammen mit einem Experten/Spezialist vorgenommen werden.
2. Aufgrund der Poly-Reaktivität von Autoimmun-Antikörpern und Unterschieden in der geographischen Prävalenz, dürfen Assay-Ergebnisse nur zur Unterstützung der klinischen Bewertung der Neuropathie durch einen Experten/Spezialisten in Kombination mit dem klinischen Bild des Patienten verwendet werden (Ref. 2).
3. Dieser Test wurde nicht für Plasmaphereseproben validiert.
4. Intravenöse Immunglobuline (IVIg) können die Testergebnisse beeinflussen.

REFERENZINTERVALLE UND TOLERANZGRENZEN

Das Referenzintervall des BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA wurde gemäss CLSI C28-A3 mit 120 Serumproben von selbsterklärt gesunden Individuen ermittelt. Die Verteilungshäufigkeit von anti-Gangliosid-Antikörpern in normalen Blutspendern wurde in Titer-Kategorien eingestuft: negativ (<30 %-Verhältnis), Grauzone (30-50 %-Verhältnis) und positiv (>50 %-Verhältnis). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Der Grenzwert für Positivität ist ein 50%-Verhältnis.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Antigen	IgG/IgM Mix		
	Werte (%-Verhältnis)		
	<30	30-50	>50
GD1b	Negativ	Erneutes Prüfen zu einem späteren Zeitpunkt	Positiv
GQ1b			
GM1			

Tabelle 3

Die Testergebnisse müssen in Verbindung mit Informationen aus dem klinischen Bild des Patienten und anderen diagnostischen Tests interpretiert werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Laborinterne Präzision: 5,7 – 13,2% CV

Die laborinterne Präzision wurde gemäss CLSI-Leitlinie EP05-A3 mit dem standardisierten Studiendesign 20 Tage x 2 Läufe x 2 Replikate ermittelt. Es wurden drei (3) gepoolte Serumproben von Patienten getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Reproduzierbarkeit: 7,7 – 19,1% CV

Die Reproduzierbarkeit wurde gemäss CLSI-Leitlinie EP05-A3 mit einem Studiendesign 3 Geräte/Chargen/Bediener x 5 Tage x 5 Replikate ermittelt. Es wurden drei (3) gepoolte Serumproben von Patienten getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Blindprobengrenze (LoB) ≤ Nachweisgrenze (LoD): ≤30%-Verhältnis

Die LoB und LoD wurden gemäss CLSI-Leitlinie EP17-A2 mit der nichtparametrischen Analyse ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Hochdosis Hook-Effekt

Es wurden keine Einschränkungen aufgrund eines Hochdosis-Hook-Effekts auf den Messbereich festgestellt.

Kreuzreaktivität

Nicht-systematische Kreuzreaktivität wurde bei Proben von Patienten mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen (Tabelle 11) und von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen beobachtet (Tabelle 12).

KLINISCHE LEISTUNG

Die klinische Leistung wurde durch deskriptive-Analyse wissenschaftlicher Literatur mit Peer-Review beurteilt. Fünf (5) Studien befassten sich mit der klinischen Leistung des BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA bei der Diagnose von autoimmunen peripheren Neuropathien (Ref. 3-7). Analyseergebnisse und Studiendetails befinden sich in Tabelle 4 bzw. Tabelle 13.

N periphere Neuropathie	160 (102 pädiatrische GBS, 14 CIDP, 44 GBS)
N Kontrollen	375 (104 DC, 142 NC, 129 HC)
Empfindlichkeit, Durchschnitt (95 % KI)	57,0 % (38,6 – 75,4 %)
Spezifizität, Durchschnitt (95 % KI)	79,8 % (66,8 – 93,2 %)

Tabelle 4

GBS, Guillain-Barré-Syndrom; DC, nichtneurologische Erkrankung-Kontrolle (Non-Neurological Disease Control); NC, neurologische Kontrolle (Neurological Control); HC, gesunde Kontrolle (Healthy Control); CIDP, chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie; KI, Konfidenzintervall

STÖRSUBSTANZEN

Die Anfälligkeit des Assays auf orale und injizierbare Pharmazeutika sowie auf endogene Substanzen wurde gemäss CLSI-Leitlinie EP07-A3 beurteilt. Eine Abweichung der Ergebnisse ≥ ± 20%-Verhältnis wurde als Störeinfluss betrachtet.

Für die folgenden Substanzen wurde bis zu den angegebenen Konzentrationen kein Störeinfluss festgestellt: intravenöses Immunglobulin (20 mg/mL), Rituximab (3 mg/mL), Cladribin (273 ng/mL), Interferon alpha-2a (49,5 ng/mL), Gabapentin (26,7 µg/mL), Ibuprofen (0,22 mg/mL), Chlorambucil (1,96 µg/mL), Prednison (99 ng/mL), Prednisolon (1,2 µg/mL), Rheumafaktor (2340 IU/mL), Hämoglobin (10 mg/mL), Hämolysat (10 mg/mL), Triglycerid (15 mg/mL), konjugiertes Bilirubin (20 µg/mL), nicht konjugiertes Bilirubin (150 µg/mL).

Mikrotiterplattenanordnung: IgG/IgM-Mix-Marker

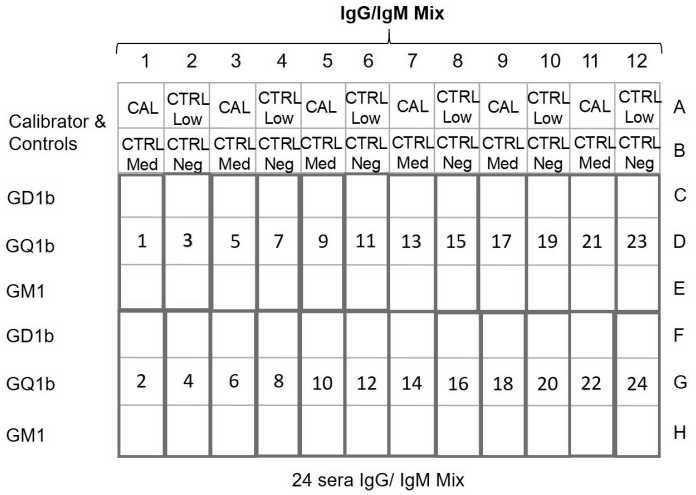


Abbildung 1A: ≤ 24 Seren / Kit (1 MP / Kit)

Mikrotiterplattenanordnung: IgG & IgM Marker

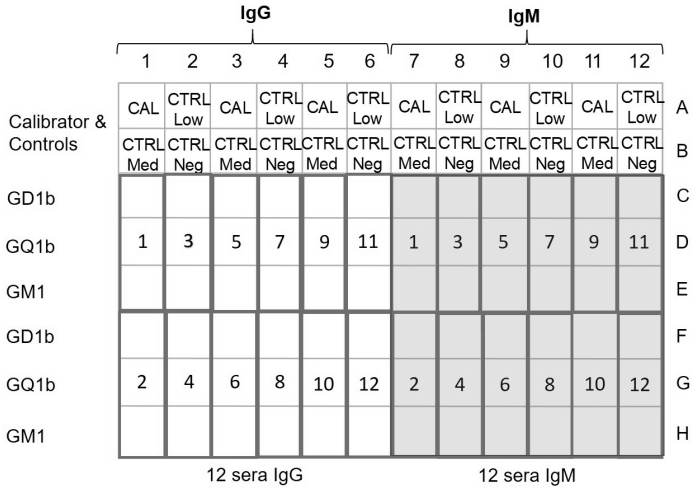


Abbildung 1B : 2 Profile / Serum, ≤ 12 Seren / Kit (1 MP / Kit)

Examplarische Ergebnisse

A IgG/IgM-Mix-Marker

B-GCO-ELGM	Absorption (OD450)	Verhältnis [%]
Kalibrator	1,415	
	1,445	
Kalibrator Durchschnitt	1,430	200
Kontrolle Medium	0,498	69
	0,482	67
Kontrolle Medium Durchschnitt	0,490	68
Kontrolle Tief	0,195	27
	0,191	26
Kontrolle Tief Durchschnitt	0,193	27
Negative Kontrolle	0,090	12
	0,100	14
Negative Kontrolle Durchschnitt	0,095	13
Probe 1 GM1	0,544	76
Probe 1 GD1b	0,745	104
Probe 1 GQ1b	0,090	13

Tabelle 5

B IgG- & IgM-Marker

Enzymmarker	Absorption (OD450)		Verhältnis [%]	
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM	IgG	IgM	IgG	IgM
Kalibrator	1,789	2,576		
	1,833	2,527		
Kalibrator Durchschnitt	1,836	2,551	100	100
Kontrolle Medium	1,267	1,743	69	68
	1,237	1,764	67	69
Kontrolle Medium Durchschnitt	1,252	1,753	68	69
Kontrolle Tief	0,567	0,938	30	37
	0,584	0,942	32	37
Kontrolle Tief Durchschnitt	0,571	0,940	31	37
Negative Kontrolle	0,061	0,098	3	4
	0,051	0,095	3	4
Negative Kontrolle. Durchschnitt	0,056	0,097	3	4
Probe 1 GM1	0,171	3,814	9	150
Probe 1 GD1b	1,021	0,354	56	14
Probe 1 GQ1b	0,378	0,208	21	8

Tabelle 6

Referenzintervall

Analyt	% normaler Blutspender in Kategorien			Referenzgrenze
	<30 %-Verhältnis	30 - 50 %-Verhältnis	>50 %-Verhältnis	(90 % KI)
anti-GM1 IgG	99,2	0,8	0,0	16 (13,0 – 29,8)
anti-GM1 IgM	95,8	3,3	0,8	24 (14,3 – 40,3)
anti-GM1 IgGM	95,0	4,2	0,8	34 (23,3 – 49,5)
anti-GD1b IgG	97,5	1,7	0,8	21 (14,5 – 33,0)
anti-GD1b IgM	99,2	0,0	0,8	15 (6,3 – 15,5)[F] 9 (6,4 – 54,7)[M]
anti-GD1b IgGM	95,0	3,3	1,7	30 (22,3 – 71,6)
anti-GQ1b IgG	97,5	2,5	0,0	24 (14,6 – 33,4)
anti-GQ1b IgM	99,2	0,8	0,0	8 (6,2 – 17,8)
anti-GQ1b IgGM	95,0	4,2	0,8	31 (23,1 – 46,7)

F weibliche Untergruppe. *M* männliche Untergruppe

Tabelle 7

TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Laborinterne Präzision

Probenbeschreibung			Laborinterne Präzision			
Analyt	**Enzym-marker (Isotyp)**	**Erwartete Kategorie [%Verhältnis]**	**N**	**Mittelwert [%Verhältnis]**	**SD [%Verhältnis]**	**VK [%]**
anti-GM1 Ab	IgM	30-50	80	48	3,5	7,2
		>50	80	91	6,2	6,8
	IgG	30-50	80	40	5,1	12,9
		>50	80	106	13,1	12,4
anti-GQ1b Ab	IgM	30-50	80	45	2,6	5,7
		>50	80	85	6,7	7,8
	IgG	30-50	80	43	5,7	13,2
		>50	80	80	6,9	8,6

Tabelle 8

Reproduzierbarkeit

Probenbeschreibung			Reproduzierbarkeit			
Analyt	**Enzym-marker (Isotyp)**	**Erwartete Kategorie [%Verhältnis]**	**N**	**Mittelwert [%Verhältnis]**	**SD [%Verhältnis]**	**VK [%]**
anti-GM1 Ab	IgM	30-50	75	51	4,9	9,7
		>50	75	94	7,2	7,7
	IgG	30-50	75	39	5,6	14,5
		>50	75	106	17,1	16,1
anti-GQ1b Ab	IgM	30-50	75	48	3,9	8,2
		>50	75	92	9,9	10,7
	IgG	30-50	75	42	8,1	19,1
		>50	75	78	12,0	15,4

Tabelle 9

LoD and LoB

Analyt	LoB [%-Verhältnis]	LoD [%-Verhältnis]
Anti-GM1 IgM Ab	5	21
Anti-GM1 IgG Ab	6	15
Anti-GQ1b IgM Ab	3	17
Anti-GQ1b IgG Ab	8	18

Tabelle 10

Kreuzreaktivität

Zugewiesener Antikörper	Diagnose	#
Anti-Neutrophile cytoplasmatischer Antikörper (ANCA)	Vasculitis	3
	Andere (ANCA positiv bezeichnete Proben)	10
Antinukleäre Antikörper (ANA)	Systemische Lupus erythematodes	5
	Rheumatoide Arthritis	9
	Sjögren-Syndrom	6
	Andere (ANA positiv bezeichnete Proben)	3
Anti-Thyroglobulin Antikörper (anti-Tg)	Autoimmunthyreoiditis	5
Anti-ribonucleoprotein Antikörper	Mischkollagenose	1
Anti-GQ1b, Anti-GM1, Anti-GD1b	Autoimmune periphere Neuropathie	1
Anti-Acetylcholinrezeptor-Antikörper und Anti-muskelspezifische Tyrosinkinase	Myasthenia gravis	7

Tabelle 11

Periphere Neuropathien	#
Alkoholiker	1
Diabetiker	5
Periphere Neuropathie imitierende Erkrankungen	**#**
Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	15
Sarkoidose	4
Waldenström-Makroglobulinämie (WM)	4
Chagas-Krankheit	5

Tabelle 12

Klinische Leistung

Studie	Positive Kontrollen (Fälle)	Negative Kontrollen	Epi-top	Em-pfindlich-keit	Spezifizi-tät
Hashemilar et al., 2014	Pädiatri-sches GBS (n = 45)	DC (n = 35)	GM1	0,51	0,89
			GQ1b	0,56	0,74
Sharma et al., 2011	Pädiatri-sches GBS (n = 57)	NC (n = 42)	GM1	0,82	0,33
		DC (n = 35)			0,83
Khandelwal et al., 2006	GBS (n = 13)	HC (n = 19)	GM1	0,31	0,74
Uetz-von Allmen et al., 1998	GBS, CIDP (n = 19, 14)	NC (n = 100)	GM1	0,30	0,93
		HC (n = 110)			0,95
Spatola et al., 2016	GBS (MFS) (n = 12)	DC (n = 34)	GQ1b	0,92	0,97

Tabelle 13

GBS, Guillain-Barré-Syndrom; DC, nichtneurologische Erkrankung-Kontrolle (Non-Neurological Disease Control); NC, neurologische Kontrolle (Neurological Control); HC, gesunde Kontrolle (Healthy Control); MFS, Miller Fisher Syndrom; CIDP, chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie

BÜHLMANN GanglioCombi® *Light* ELISA

Beschichtete Mikrotiterplatte

↓ *2 x mit ≥300 µL (kaltem!) Waschpuffer waschen*

100 µL Kalibrator, Kontrollen oder Serumproben (1:50)

↓ *2 Stunden (±5 Minuten) bei 2-8 °C inkubieren*

3 x mit ≥300 µL (kaltem!) Waschpuffer waschen

100 µL Enzymmarker hinzugeben

↓ *2 Stunden (±5 Minuten) bei 2-8 °C inkubieren*

3 x mit ≥300 µL (kaltem!) Waschpuffer waschen

100 µL TMB-Substrat hinzugeben (Raumtemperatur)!

↓ *30 Minuten (±2 Minuten) bei 18-28 °C auf einem Plattenschüttler bei ~400-600 U/min inkubieren*

100 µL Stopp-Lösung hinzugeben (Raumtemperatur)!

➡ **Absorption bei 450 nm lesen (innerhalb von 30 Minuten)**

ZEIT BIS ZUM ERGEBNIS: 4,5 Stunden

REFERENZEN

1. Blirup-Jensen, S., Johnson, A. M. & Larsen, M. Protein standardization V: Value transfer. A practical protocol for the assignment of serum protein values from a Reference Material to a Target Material. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46, 1470–1479 (2008).

2. Bourque, P. R. et al. Autoimmune peripheral neuropathies. *Clinica Chimica Acta* 449, 37–42 (2015).

3. Hashemilar, M. et al. Evaluating the status of antiganglioside antibodies in children with Guillain-Barré syndrome. Neuroimmunomodulation 21, 64–68 (2013).

4. Sharma, M. B. et al. The presence of Mycoplasma pneumoniae infection and GM1 ganglioside antibodies in Guillain-Barré syndrome. J. Infect. Dev. Ctries. 5, 459–464 (2011).

5. Uetz-von Allmen, E. et al. Antiganglioside GM1 antibodies and their complement activating capacity in central and peripheral nervous system disorders and in controls. Eur. Neurol. 39, 103–110 (1998).

6. Spatola, M., Du Pasquier, R., Schluep, M. & Regeniter, A. Serum and CSF GQ1b antibodies in isolated ophthalmologic syndromes. Neurology 86, 1780–1784 (2016).

7. Khandelwal, D. et al. IgM anti-GM1 antibody titers in patients with monomelic amyotrophy. Neurol. India 54, 399–401 (2006).

ÄNDERUNGSLOG

Datum	Version	Änderung
2023-08-17	A1	Änderung an *Verwendungszweck* und Produktnamen Neuformulierung des *Testprinzip* mit Titerkategorien negativ, Grauzone und positiv Neue „In-use“ Stabilität von Reagenzien Aktualisierung des Kapitels *Warnhinweise und Vorsichtsmassnahmen* Änderung der Kapitel *Probenentnahme und Lagerung, Testdurchführung,* und *Standardisierung und messtechnische Rückverfolgbarkeit* Neuformulierung des Kapitels *Qualitätskontrolle* Aktualisierung des Kapitels *Leistungseinschränkungen* Änderung der Kapitel *Referenzintervalle und Toleranzgrenzen, Leistungsmerkmale,* und *Störsubstanzen* Einführung des Kapitels *Klinische Leistung* Änderung der Kapitel *Referenzen* und *Symbole* Aufnahme der Nummer der benannten Stelle zur CE-Kennzeichnung – Konformitätsbewertungsverfahren gemäss IVDR 2017/746

MELDUNG VON ZWISCHENFÄLLEN IN EU-MITGLIEDSSTAATEN

Falls sich ein ernsthafter Zwischenfall in Zusammenhang mit diesem Produkt ereignet hat, bitte melden Sie dies umgehend dem Hersteller und der zuständigen Behörde Ihres Mitgliedsstaates.

SCHÄDEN BEIM VERSAND

Bitte informieren Sie Ihren Vertriebspartner, falls dieses Produkt beim Empfang beschädigt war.

SYMBOLE

BÜHLMANN verwendet Symbole und Zeichen, die in ISO 15223-1 aufgeführt und beschrieben sind. Darüber hinaus werden die folgenden Symbole und Zeichen verwendet:

Symbol	Erklärung
MP	Mikrotiterplatte
BUF WASH 10X	Waschpufferkonzentrat (10x)
BUF INC	Inkubationspuffer
CAL	Kalibrator
CONTROL -	Kontrolle Negativ
CONTROL L	Kontrolle Tief
CONTROL M	Kontrolle Medium
EL IgG	Enzymmarker IgG
EL IgM	Enzymmarker IgM
EL MIX	Enzymmarker IgG/IgM Mix
SUBS TMB	TMB-Substrat
SOLN STOP	Stopp-Lösung

CE 0123