BÜHLMANN
GanglioCombi® MAG ELISA

mit Enzymmarkern IgG/IgM Mix, IgG und IgM

Nachweis von anti-Gangliosid- und anti-MAG-Antikörpern durch ELISA

(HNK-1 („MAG”), GM1, GT1a, GD1a, GD1b und GQ1b)

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

EK-GCM 2 x 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® MAG 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® MAG ELISA ermöglicht das Messen von Gangliosid- und Myelin-assoziierten Glykoprotein- (MAG-)Antikörpern in Serum. Die Mikrotiterplatte ist mit Gangliosiden beschichtet: GM1, GT1a, GD1a, GD1b, GQ1b und den chemisch synthetisiertem HNK-1-Epitop des MAG-Glycoproteins (Ref. 1).
Zu den Wells der Mikrotiterplatte werden Patientenseren, Kontrollen und Kalibratoren hinzugegeben. Nach 2 Stunden Inkubationszeit bei 2 – 8 °C und Waschschritten, weisen mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte Nachweis-antikörper (anti-IgG/IgM, anti-IgG, anti-IgM) die anti-Gangliosid- und/oder anti-MAG-Antikörper nach, die an die immobilisierten Ganglioside oder HNK-1 auf der Platte gebunden sind. 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 und HNK-1	2 x12 x 8 Well-Streifen mit Rahmen	B-GCM-MP	Gebrauchsfertig
Abdeckfolie	6 Stück		
Waschpufferkonzentrat (10x) mit Konservierungsstoffen	2 Flaschen 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 Konservierungsstoffen	2 Fläschchen x 11 mL	B-GCO-ELGM	Gebrauchsfertig
Enzymmarker IgG Anti-Human IgG-Antikörper, konjugiert mit HRP, in einer Puffermatrix mit Konservierungsstoffen	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	2 Fläschchen x 11 mL	B-TMB	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0,25 M Schwefelsäure	2 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

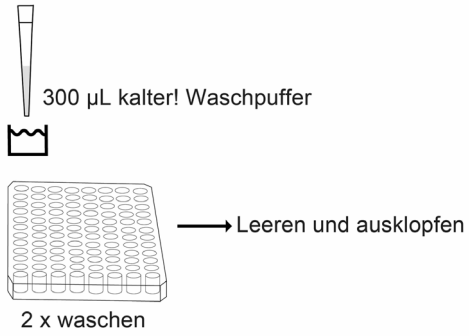
(2) Nachweis von IgG- oder IgM-Isotypen: In Schritt 7 entweder Enzymmarker IgG oder Enzymmarker IgM hinzugeben

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

1. Die Proben 1:50 mit kaltem! (2-8 °C) Inkubationspuffer verdünnen (z.B. 20 µL Serum + 980 µL Inkubationspuffer). 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).

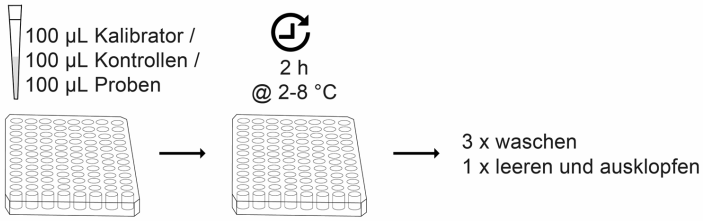
4c. 100 µL der verdünnten Probe 1 in Wells C1-H1 pipettieren (siehe Abbildung 1A oder 1B).

4d. 100 µL der verdünnten Probe 2 in Wells C2-H2 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.



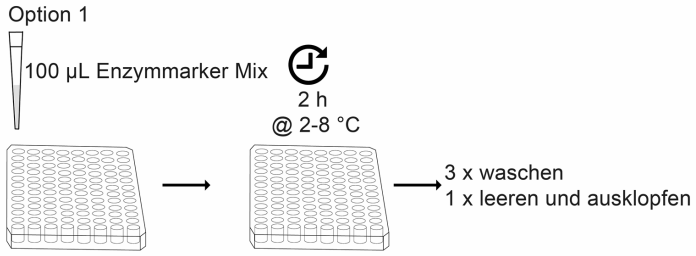
Für Option 1: Nachweis von Mix-Isotyp

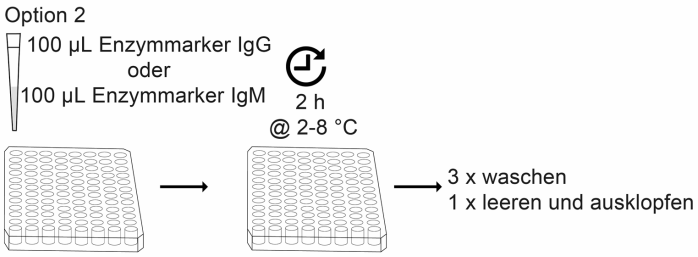
7. 100 µL Mix zu den Wells hinzugeben.

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

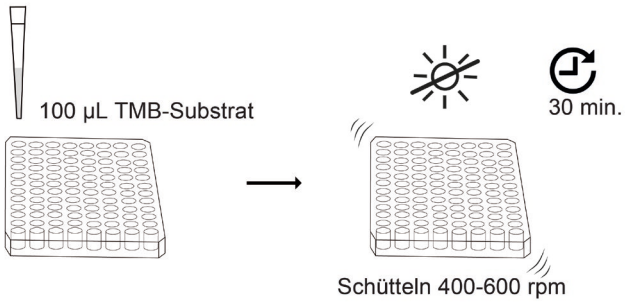
7'. 100 µL entweder Enzymmarker IgG oder IgM zu den jeweiligen Wells hinzugeben (siehe Abbildung 1B).

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.



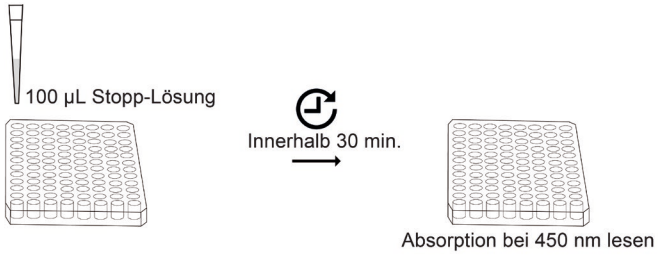


10. 100 µL TMB-Substratlösung (auf Raumtemperatur gebracht) zu jedem Well hinzugeben.
11. Die Platte mit einer Abdeckfolie abdecken, vor Licht schützen und bei 18-28 °C 30 ±2 Minuten auf einem auf 400-600 U/min eingestellten Mikrotiterplatten-Schüttler inkubieren.



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® MAG 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-Gangliosid- oder anti-MAG-Antikörper in Serumproben gibt es keine international oder national anerkannten Referenzmaterialien oder Referenz-Messverfahren. Der BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA wird gegen intern erstellte Referenzmaterialien standarisiert. Die Kalibratorwerte werden gemäss einem Werteübertragungsprotokoll (Ref. 2) 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 7 und 8 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 im 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. 3).
3. Dieser Test wurde nicht für Plasmaphereseproben validiert.
4. Intravenöse Immunglobuline (IVIg) können die Testergebnisse beeinflussen.

REFERENZINTERVALLE UND TOLERANZGRENZEN

Das Referenzintervall des BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA wurde gemäss CLSI C28-A3 mit 120 Serumproben von selbsterklärt gesunden Individuen ermittelt. Die Verteilungshäufigkeit von anti-Gangliosid- und anti-MAG-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 9 zusammengefasst. Der Grenzwert für Positivität ist ein 50%-Verhältnis.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

<table>
<tr><th rowspan="3">Antigen</th><th colspan="3">IgG/IgM Mix</th></tr>
<tr><th colspan="3">Werte (%-Verhältnis)</th></tr>
<tr><th><30</th><th>30-50</th><th>>50</th></tr>
<tr><td>HNK-1</td><td rowspan="6">Negativ</td><td>Siehe Anmerkung */**</td><td>Siehe Anmerkung */**</td></tr>
<tr><td>GM1</td><td rowspan="5">Erneutes Prüfen zu einem späteren Zeitpunkt</td><td rowspan="5">Positiv</td></tr>
<tr><td>GT1a</td></tr>
<tr><td>GD1a</td></tr>
<tr><td>GD1b</td></tr>
<tr><td>GQ1b</td></tr>
</table>

Tabelle 3

Antigen	IgG		
	Werte (%-Verhältnis)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Negativ	Siehe Anmerkung *	Siehe Anmerkung *
GM1		Erneutes Prüfen zu einem späteren Zeitpunkt	Positiv
GT1a			
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

Tabelle 4

Antigen	IgM		
	Werte (%-Verhältnis)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Negativ	Siehe Anmerkung **	Positiv (siehe Anmerkung **)
GM1		Erneutes Prüfen zu einem späteren Zeitpunkt	Positiv
GT1a			
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

Tabelle 5

Die Testergebnisse müssen in Verbindung mit Informationen aus dem klinischen Bild des Patienten und anderen diagnostischen Tests interpretiert werden.
* MAG-Neuropatie ist gewöhnlich mit dem Vorhandensein von anti-MAG Antikörpern des IgM-Isotyps assoziiert (Ref. 4).
** Ergebnisse zwischen 30 und 50% (Grauzone) oder > 50% (positiv) für HNK-1, die aus dem Mix oder Enzymmarker IgM resultieren, können mit den anti-MAG-Antibodies ELISA (EK-MAG) erneut getestet werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Methodenvergleich

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA vs anti-MAG-Antibodies ELISA

Die Methodenvergleichsstudie wurde gemäss der CLSI-Leitlinie EP09-A3 and EP12-A2 durchgeführt. Einhundertundzweiundzwanzig (122) Proben wurden anhand 2 Chargen von BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA und 2 Chargen von anti-MAG-Antibodies ELISA gemessen. Die diagnostische (Kappa-) Übereinstimmung, die negative prozentuale Übereinstimmung und die positive prozentuale Übereinstimmung wurden ermittelt. Die Übereinstimmungen sind in Tabelle 10 dargestellt.

Laborinterne Präzision

Für anti-Ganglioside: 5,7 – 13,2% VK
Für anti-MAG: 14,4 – 36,5% VK

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 11 zusammengefasst.

Reproduzierbarkeit

Für anti-Ganglioside: 7,7 – 19,1% VK
Für anti-MAG: 23,5 – 33,2% VK

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 12 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 13 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 14) und von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen beobachtet (Tabelle 15).

KLINISCHE LEISTUNG

Die klinische Leistung wurde durch zusammenfassende Analyse wissenschaftlicher Literatur mit Peer-Review beurteilt. Sechs (6) Studien befassten sich mit der klinischen Leistung des BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA bei der Diagnose von autoimmunen peripheren Neuropathien (Ref. 5-10). Analyseergebnisse und Studiendetails befinden sich in Tabelle 6 bzw. Tabelle 16.

N periphere Neuropathie	201 (102 pädiatrische GBS, 14 CIDP, 44 GBS, 41 anti-MAG Neuropathie)
N Kontrollen	493 (104 DC, 254 NC, 135 HC)
Empfindlichkeit (95% KI)	68,1% (39,6 – 87,5%)
Spezifizität (95% KI)	88,0% (72,3 – 95,3%)
ROC AUC	0,85

Tabelle 6

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; ROC AUC, Bereich unter der ROC-Kurve

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).

TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Mikrotiterplattenanordnung: IgG/IgM-Mix-Marker

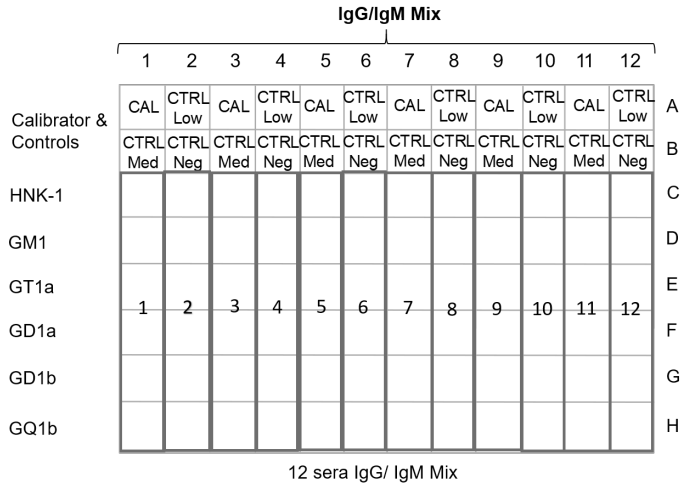


Abbildung 1A: ≤ 24 Seren / Kit (2 MP / Kit)

Mikrotiterplattenanordnung: IgG & IgM Marker

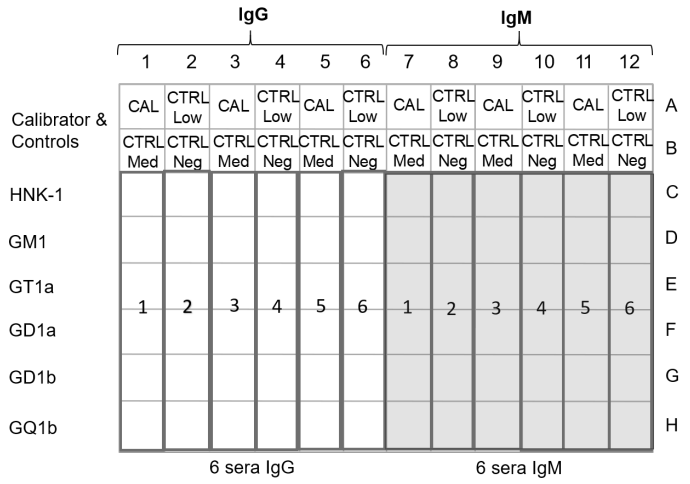


Abbildung 1B : 2 Profile / Serum, ≤ 12 Seren / Kit (2 MP / Kit)

Examplarische Ergebnisse

A IgG/IgM-Mix-Marker

B-GCO-ELGM	Absorption (OD450)	Verhältnis [%]
Kalibrator Kalibrator Durchschnitt	2,179 2,477 2,328	100
Kontrolle Medium Kontrolle Medium Durchschnitt	1,737 1,891 1,814	78
Kontrolle Tief Kontrolle Tief Durchschnitt	0,662 0,460 0,561	24
Negative Kontrolle Negative Kontrolle Durchschnitt	0,044 0,046 0,045	2
Probe 1 HNK-1	0,234	10
Probe 1 GM1	0,543	23
Probe 1 GT1a	1,976	85
Probe 1 GD1a	0,621	27
Probe 1 GD1b	0,734	32
Probe 1 GQ1b	2,573	111

Tabelle 7

B IgG- & IgM-Marker

Enzymmarker	Absorption (OD450)		Verhältnis [%]	
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM	IgG	IgM	IgG	IgM
Kalibrator Kalibrator Durchschnitt	2,488 2,446 2,467	2,411 2,201 2,306	100	100
Kontrolle Medium Kontrolle Medium Durchschnitt	1,879 1,987 1,933	1,734 1,818 1,776	78	77
Kontrolle Tief Kontrolle Tief Durchschnitt	0,452 0,716 0,584	0,501 0,609 0,555	24	24
Negative Kontrolle Negative Kontrolle. Durchschnitt	0,045 0,037 0,041	0,048 0,042 0,045	2	2
Probe 1 HNK-1	0,423	0,621	17	27
Probe 1 GM1	2,001	2,102	81	91
Probe 1 GT1a	0,521	0,237	21	10
Probe 1 GD1a	1,984	0,821	80	36
Probe 1 GD1b	0,473	1,923	19	83
Probe 1 GQ1b	0,094	0,911	4	40

Tabelle 8

TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Referenzintervall

Analyt	% normaler Blutspender in Kategorien			Referenzgrenze
	<30 %-Verhältnis	30 - 50 %-Verhältnis	>50 %-Verhältnis	(90 % KI)
anti-MAG IgG	96,7	2,5	0,8	25 (15,7 – 39,5)
anti-MAG IgM	99,2	0,8	0,0	20 (18.6 – 28,4)
anti-MAG IgGM	86,7	10,0	3,3	44 (34,8 – 52,9)
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-GT1a IgG	90,0	6,7	3,3	44 (35,9 – 113,1)
anti-GT1a IgM	97,5	2,5	0,0	16 (10,3 – 31,8)
anti-GT1a IgGM	85,0	10,0	5,0	50 (42,4 – 140,3)
anti-GD1a IgG	91,7	5,0	3,3	42 (26,2 – 108,2)
anti-GD1a IgM	100,0	0,0	0,0	8 (6,6 – 12,4)[F] 18 (6,6 – 24,3)[M]
anti-GD1a IgGM	88,3	5,8	5,8	53 (35,0 – 118,7)
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 9

Verfahrensvergleich für anti-MAG Antikörper

Beschreibung	N	Kappa-Übereinstimmung		NPA		PPA	
		Wert	95% KI	Wert	95% KI	Wert	95% KI
EK-GCM IgM vs. EK-MAG	122	0,88	0,80 - 0,97	100,0%	94,6% - 100,0%	87,5%	75,9%-94,8%
EK-GCM IgG/IgM Mix vs. EK-MAG	122	0,87	0,78 - 0,96	97,0%	89,5% - 99,6%	89,3%	78,1%-96,0%

Tabelle 10

NPA: Negative prozentuale Übereinstimmung
PPA: Positive prozentuale Übereinstimmung
KI: Konfidenzintervall

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
anti-MAG Ab	IgM	30-50	80	34	6,3	18,7
		>50	80	72	10,4	14,4
	IgGM	30-50	80	27	9,6	35,3
		>50	80	51	18,8	36,5

Tabelle 11

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
anti-MAG Ab	IgM	30-50	75	43	14,3	33,2
		>50	75	98	23,1	23,5
	IgGM	30-50	75	42	10,6	25,0
		>50	75	97	27,2	28,0

Tabelle 12

LoD und LoB

Analyt	LoB [%-Verhältnis]	LoD [%-Verhältnis]
Anti-GM1 IgM Ab	5	21
Anti-GM1 IgG Ab	6	15
Anti-MAG IgM Ab	12	26
Anti-MAG IgG/IgM Mix Ab	14	27
Anti-GQ1b IgM Ab	3	17
Anti-GQ1b IgG Ab	8	18

Tabelle 13

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 14

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

Tabelle 15

TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Klinische Leistung

Studie	Positive Kontrollen (Fälle)	Negative Kontrollen	Epitop	Empfindlichkeit	Spezifizität
Hashemilar et al., 2014	Pädiatrisches GBS (n = 45)	DC (n = 35)	GM1	0,51	0,89
			GQ1b	0,56	0,74
Sharma et al., 2011	Pädiatrisches 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
Delmont et al., 2019	MAG-Neuropathie (n = 41)	NC (n = 112) HC (n = 6)	HNK-1 (MAG)	0,98	0,99

Tabelle 16

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® MAG 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. Herrendorff, R. et al. Selective in vivo removal of pathogenic anti-MAG autoantibodies, an antigen-specific treatment option for anti-MAG neuropathy. *PNAS* **114**(18), E3689-E3698 (2017).

2. 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).

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

4. Steck, A. J. Anti-MAG neuropathy: From biology to clinical management. J. Neuroimmunology **361** (2021).

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

6. 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).

7. 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).

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

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

10. Delmont, E. et al. Relevance of anti-HNK1 antibodies in the management of anti-MAG neuropathies. *J. Neurol*. **266**, 1973–1979 (2019).

ÄNDERUNGSLOG

Datum	Version	Änderung
2023-08-17	A1	Änderung an *Verwendungszweck* und Produktnamen Entfernen von GM2 Gangliosid und Hinzufügen von GT1a Gangliosid 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