# BÜHLMANN
# GanglioCombi® MAG ELISA

## su fermentiniais žymenimis IgG/IgM mišinys, IgG ir IgM

Anti-gangliozidų ir -MAG antikūnų
aptikimas ELISA metodu
(HNK-1 (“MAG”), GM1, GT1a, GD1a, GD1b ir GQ1b)

*In vitro* diagnostikai

EK-GCM 2 x 96 testai

Išleidimo data: 2023-08-17
Versija A1

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

# LIETUVIŠKAI

## PASKIRTIS

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA yra *in vitro* diagnostinis tyrimas, skirtas pusiau kiekybiniam IgG ir (arba) IgM antikūnų prieš atrinktus nervinius antigenus / epitopus serumo mėginiuose nustatymui. Tyrimo rezultatai gali būti naudojami autoimuninių periferinių neuropatijų diagnozei pagrįsti kartu su kitais klinikiniais ir laboratoriniais duomenimis.

Laboratoriniam naudojimui.

## NUMATOMAS TAIKYMAS

Trys fermentiniai žymenys, pateikti rinkinyje, įgalina tris skirtingus testavimo algoritmus:

1. Tyrimas su IgG/IgM konjugato mišiniu (toliau vadinamas mišiniu) leidžia patikrinti, ar nėra antineuroninių antikūnų, rodančių autoimuninę neuropatiją.
2. Tyrimas su individualiais IgG ir (arba) IgM konjugatais leidžia nustatyti antikūnų izotipus.
3. Atliekant laboratorinį tyrimą, jeigu to reikia, pradinė mėginių atranka naudojant mišinį (1 parinktis) gali būti papildoma mišinio teigiamų mėginių diferencijavimu naudojant atskirus IgG ir IgM konjugatus (2 parinktis).

## TYRIMO PRINCIPAS

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA leidžia išmatuoti gangliozido ir mielinu susijusių glikoproteinų (MAG) antikūnus serume. Mikrotitravimo plokštelė padengta gangliozidais: GM1, GT1a, GD1a, GD1b, GQ1b ir chemiškai susintetintu MAG glikoproteino HNK-1 epitopu (1 nuoroda).
Paciento serumai, kontroliniai mėginiai ir kalibratorius dedami į mikrotitravimo plokštelės šulinėlius. Po 2 valandų inkubacijos 2–8 °C temperatūroje ir plovimo etapų, aptikimo antikūnai (anti-IgG/IgM, anti-IgG, anti-IgM), konjuguoti su krienų peroksidaze (HRP), aptinka antigangliozidą ir (arba) anti-MAG antikūnus, prisijungusius prie plokštelėje esančių imobilizuotų gangliozidų arba HNK-1. Po dar 2 valandų inkubavimo ir tolesnių plovimo etapų pridedamas chromogeninis HRP substratas, tetrametilbenzidinas (TMB) (susidaro mėlyna spalva), po to sustabdoma reakcija (pakeičiama į geltoną spalvą). Sugertis matuojama esant 450 nm.
Išmatuota absorbcija yra proporcinga tam tikrame mėginyje esančių antikūnų titrui. Antikūnų titrai išreiškiami kalibratoriaus procentais ir gali būti priskirti titrų kategorijoms (neigiama, pilka zona, teigiama).

## PATEIKTI REAGENTAI IR PARUOŠIMAS

| Reagentai | Kiekis | Kodas | Pristatymas |
|---|---|---|---|
| **Mikrotitro plokštelė**<br>iš anksto padengtas gangliozidais ir HNK-1 | 2 x12 x 8 šulinėlių juostelės su rėmeliu | B-GCM-MP | Paruoštas naudojimui |
| **Plokštės sandariklis** | 6 vienetai | | |
| **Plovimo buferio koncentratas (10x)**<br>su konservantais | 2 buteliukai<br>x 100 mL | B-GCO-WB | Praskieskite su 900 mL dejonizuoto vandens |
| **Inkubavimo buferis**<br>su konservantais | 1 butelis<br>x 100 mL | B-GCO-IB | Paruoštas naudojimui |
| **Kalibratorius**<br>liofilizuoti su konservantais | 1 mėgintuvėlis | B-GCO-CA | Įpilkite 1,5 mL inkubacinio buferio |
| **Neigiama, žema ir vidutinė kontrolės** [1]<br>liofilizuoti su konservantais | 3 mėgintuvėliai | B-GCO-CONSET | Įpilkite 1,5 mL inkubacinio buferio |
| **Fermentinis žymuo IgG/IgM mišinys**<br>anti-žmogaus IgG ir IgM antikūnai, konjuguoti su HRP buferinėje matricoje su konservantais | 2 mėgintuvėliai<br>x 11 mL | B-GCO-ELGM | Paruoštas naudojimui |
| **Fermentinis žymuo IgG**<br>anti-žmogaus IgG antikūnas, konjuguotas su HRP buferinėje matricoje su konservantais | 1 mėgintuvėlis<br>x 11 mL | B-GCO-ELG | Paruoštas naudojimui |
| **Fermentinis žymuo IgM**<br>anti-žmogaus IgM antikūnas, konjuguotas su HRP buferinėje matricoje su konservantais | 1 mėgintuvėlis<br>x 11 mL | B-GCO-ELM | Paruoštas naudojimui |
| **TMB Substratas**<br>TMB citrato buferyje | 2 mėgintuvėliai<br>x 11 mL | B-TMB | Paruoštas naudojimui |
| **Stop tirpalas**<br>0.25 M sieros rūgštis | 2 mėgintuvėliai<br>x 11 mL | B-STS | Paruoštas naudojimui<br>**Ardanti medžiaga** |

1 lentelė

[1] Kontrolėse yra specifinių anti-GM1 antikūnų kiekių. Faktinį vidutinį OD (optinį tankį) ir % santykį žr. papildomame kokybės kontrolės duomenų lape.

## REAGENTŲ LAIKYMAS IR TINKAMUMO LAIKAS

| **Sandarūs/ Neatidaryti reagentai** | |
|---|---|
| Laikyti 2-8 °C temperatūroje. Nenaudokite reagentų pasibaigus galiojimo laikui, nurodytam etiketėse. | |
| **Atidaryti reagentai / ištirptinti reagentai** | |
| Mikrotitro plokštelė | Nepanaudotas juosteles nedelsdami grąžinkite į folijos maišelį, kuriame yra sausiklio pakuotės, ir vėl užsandarinkite per visą užtrauktuko sandariklio kraštą.<br>2-8 °C temperatūroje laikyti iki 6 mėnesių. |
| Skiestas plovimo buferis | 2-8 °C temperatūroje laikyti iki 6 mėnesių. |
| Inkubacijos buferis | |
| Fermentiniai žymenys | |
| TMB substrataas | |
| Kalibratorius | |
| Kontrolės | |
| Stop tirpalas | 18-28 °C temperatūroje laikyti iki 6 mėnesių. |

2 lentelė

## REIKALINGOS, BET NETIEKIAMOS MEDŽIAGOS

- Tikslios pipetės su vienkartiniais antgaliais: 10 µL, 20 µL,100 µL ir 1000 µL
- Vienkartiniai polistireno arba polipropileno mėgintuvėliai mėginių skiedimams ruošti
- 1000 mL talpos cilindras plovimo buferiui praskiesti
- Mikrotitravimo plokštelės ploviklis
- Sugeriamasis popieriaus
- Mikrotitravimo plokštelių purtyklė
- Mikrotitravimo plokštelės skaitytuvas absorbcijai prie 450 nm matuoti

## ATSARGUMO PRIEMONĖS

### Saugos priemonės

- Šio rinkinio kalibratoriuje ir kontrolėje yra žmogaus kilmės komponentų. Nors buvo ištirta ir nustatyta, kad HBV, HCV ir ŽIV1/2 yra neigiami, su reagentais turi būti elgiamasi taip, lyg jie galėtų perduoti infekcijas, ir turi būti tvarkomi laikantis geros laboratorinės praktikos (GLP), taikant tinkamas atsargumo priemones.
- Šiame rinkinyje yra komponentų, klasifikuojamų pagal Reglamentą (EB) Nr. 1272/2008:
  - Stop tirpale yra sieros rūgšties (2,5 – 5 %), todėl reagentai gali sudirginti odą (H315), stipriai sudirginti akis (H319) ir ėsdinti metalus (H290).
  - Kalibratoriuje, kontrolėje ir fermentiniuose žymenyse yra 2-metil-4-izotiazolin-3-ono hidrochlorido (konc. ≥ 0,0015%), todėl reagentai gali sukelti alergines odos reakcijas (H317).
  - Inkubavimo buferyje ir plovimo buferyje yra gentamicino sulfato, todėl reagentai gali sukelti alerginę odos reakciją (H317).
- Venkite reagentų sąlyčio su oda, akimis ar gleivinėmis. Jei atsirado kontaktas, nedelsiant nuplaukite dideliu kiekiu vandens; kitu atveju gali atsirasti dirginimas/nudegimai.
- Reagentai ir chemikalai turi būti tvarkomi kaip pavojingos atliekos pagal nacionalines biologinio pavojaus saugos gaires arba reglamentą.

### Techninės atsargumo priemonės

- Prieš atlikdami testą, atidžiai perskaitykite instrukcijas. Jei reagentai bus neteisingai skiedžiami, modifikuojami arba laikomi kitomis sąlygomis nei nurodytos šioje naudojimo instrukcijoje, tai turės neigiamos įtakos testo veikimui.

### ELISA procedūra

#### Reagentų temperatūra

- Prieš pradėdami tyrimo procedūrą, paruoškite reagentus. 3–9 žingsniai: 3–9 etapuose naudojami reagentai turi būti šalti (2–8 °C) ir laikomi šaltai pipetuojant ir plaunant. Rekomendacija: Paruoškite plovimo buferį dieną prieš atlikdami tyrimą ir padėkite į šaldytuvą nakčiai.
- Atlikite visus plovimo veiksmus su šaltu (2–8 ˚C) plovimo buferiu.
- Pradėdami tyrimo procedūrą, pašildykite TMB substratą ir stop tirpalą iki kambario temperatūros (18-28 °C).

#### Plovimo žingsniai

- 3, 6 ir 9 plovimo etapai yra labai svarbūs norint pašalinti gamybos proceso likučius ir (arba) galimai nesurištus antikūnus šuliniuose.
- Primygtinai rekomenduojama naudoti automatinį plovimo įrenginį, veikiantį „plokštelės režimu“, t. y. kiekvienas proceso etapas (išpilstymas/išsiurbimas) turi būti atliekamas visoms juostelėms, nuosekliai, prieš instrumentui tęsiant kitą plovimo ciklą.
- Įsitikinkite, kad po paskutinio plovimo ciklo visi šulinėliai yra visiškai tušti.

#### Substrato inkubacija

- 11 veiksmas: purtykite mikrotitravimo plokšteles inkubuojant su substratu. Priklausomai nuo plokštelių purtyklės modelio, rekomenduojame 400-600 aps./min. Tirpalas turi judėti šuliniuose, bet neturi išsilieti.

### Rinkinio komponentai

- Komponentų negalima naudoti pasibaigus galiojimui laikui, nurodytam etiketėse.
- Nemaišykite skirtingų reagentų partijų.
- Reikia dėti visas pastangas siekiant užtikrinti, kad tarp reagentų, mėginių ar tarp šulinėlių nebūtų kryžminio užteršimo.
- Mikrošulinėlių pakartotinai naudoti negalima.

## MĖGINIŲ ĖMIMAS IR SANDĖLIAVIMAS

Procedūrai reikia atitinkamai <0,1 mL kraujo arba <50 µL serumo.

Surinkite kraują į paprastus venų punkcijos mėgintuvėlius be jokių priedų ir išvengsite hemolizės. Paruoškite serumą pagal gamintojo instrukcijas. Nupilkite serumą.

Serumo mėginiai gali būti laikomi 2-8 °C temperatūroje iki aštuonių savaičių, 28 °C temperatūroje iki vienos savaitės ir ≤-20 °C temperatūroje 16 savaičių. Užšaldytus mėginius prieš naudojimą reikia atšildyti ir kruopščiai sumaišyti švelniai sukant arba vartant.
Rekomenduojame paruošti serumo mėginių padalijimus prieš užšaldant, kad būtų išvengta pasikartojančių užšaldymo/atšildymo ciklų.

## TYRIMO PROCEDŪRA

**Galimi du pasirinkimai:**

(1) Mišinio izotipų (IgG ir IgM) aptikimas: 7 veiksme pridėkite fermentinio žymens mišinį

(2) IgG arba IgM izotipų aptikimas: 7 veiksme pridėkite arba fermentinį žymenį IgG, arba fermentinį žymenį IgM

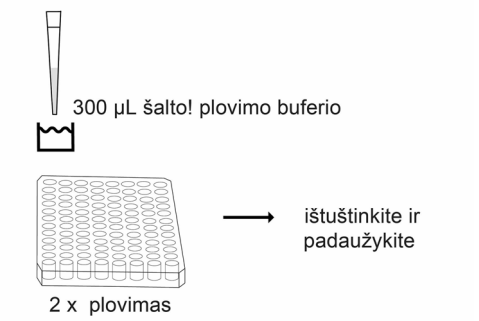
*Pastaba: TMB substrato tirpalą atšildykite iki kambario temperatūros (18-28 °C).*

1. Atskieskite mėginius 1:50 inkubaciniu buferiu. Naudokite pvz. 20 µL serumo + 980 µL šalto! (2-8 °C) inkubacinio buferio. Kruopščiai sumaišykite maišydami ir palikite atskiestus mėginius, taip pat atskiestą kalibratorių ir kontrolines medžiagas 2–8 °C temperatūroje 30 minučių prieš dozuojant pipete (žr. 4a ir b veiksmus).
2. Paruoškite plokštelės rėmą su pakankamai juostelių, kad galėtumėte ištirti reikiamą kalibratorių, kontrolinių elementų ir mėginių skaičių. Nuimkite perteklines

juosteles nuo rėmo ir nedelsdami vėl įdėkite į folijos maišelį su sausiklio pakuotėmis. Laikykite šaldytuve.

*Pastaba: 3–9 žingsniuose naudokite šaltus reagentus.*

3. Du kartus išplaukite šulinėlius, naudodami ne mažiau kaip 300 µL šalto! (2–8 °C) plovimo buferio vienoje duobutėje. Ištuštinkite šulinukus ir tvirtai patapšnokite plokštę ant sugeriančio popieriaus, kad visiškai pašalintumėte likusį skystį.




*Pastaba: nedelsdami pereikite prie kitų veiksmų.*

4a. Pipete įlašinkite 100 µL kalibratoriaus į duobutę A1 (žr. 1A pav., 1 variantui, arba 1B pav., 2 variantui).

4b. Į šulinėlį B1 pipete įpilkite 100 µL vidutinės kontrolinės medžiagos, į A2 šulinėlį žemos kontrolės ir neigiamos kontrolinės medžiagos į šulinėlį B2 (žr. 1A arba 1B pav.).

*Pastaba dėl 1 varianto: jei naudojamos daugiau nei trys juostelės per paleidimą, kalibratorius ir kontroliniai elementai gali būti bandomi dviem egzemplioriais (žr. 1A pav.).*

*Pastaba dėl 2 varianto: IgG ir IgM izotipams kalibratorius ir kontroliniai elementai turi būti paleisti atskirai (žr. 1B pav.).*

4c. 100 µL praskiesto 1 mėginio pipete dozuokite į C1-H1 šulinėlius (žr. 1A arba 1B pav.).

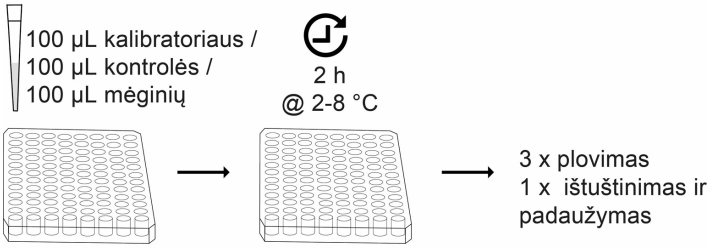
4d. 100 µL praskiesto 2 mėginio pipete dozuokite į C2-H2 šulinėlius (žr. 1A arba 1B pav.).

4e. 100 µL praskiestų mėginių 3–24 (1 variantui) arba 3–12 (2 variantui) pipete dozuokite į kitus šulinėlius (žr. 1A arba 1B pav.).

*Pastaba dėl 2 varianto: pakartokite 1–12 mėginių pipetavimą ta pačia tvarka į likusias duobutes, kad būtų galima atlikti tyrimą su antruoju izotipu.*

5. Uždenkite plokštę plokštelės sandarikliu ir inkubuokite 2 valandas (±5 min.) 2–8 °C temperatūroje (plokštelės nejudinkite).

6. Nuimkite plokštelės sandariklį. Ištuštinkite duobutes ir tris kartus išplaukite, naudodami ne mažiau kaip 300 µL šalto! (2–8 °C) plovimo buferio vienoje duobutėje.Ištuštinkite šulinukus ir tvirtai patapšnokite plokštelę ant sugerenčio popieriaus, kad visiškai pašalintumėte plovimo buferį.




**1 variantui: Mišinio-izotipo aptikimas**

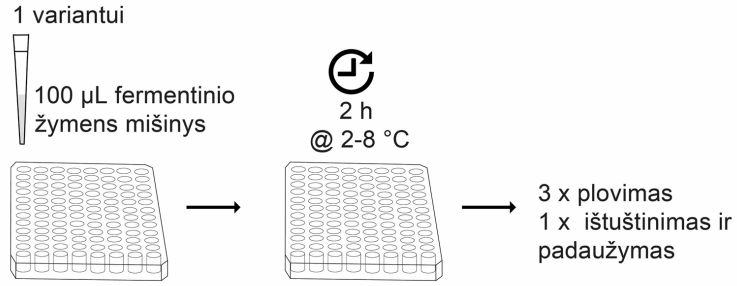
7. Į šulinėlius įpilkite 100 µL mišinio

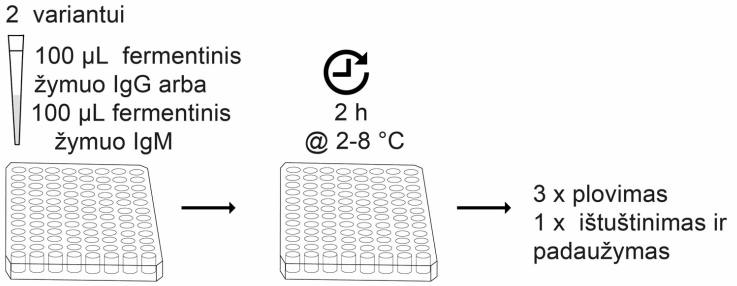
**2 variantui: IgM ir IgG izotipų aptikimas**

7'. Į atitinkamus šulinėlius įpilkite 100 µL arba fermentinio žymens IgG arba IgM (žr. 1B pav.)

8. Uždenkite plokštę plokštelės sandarikliu ir inkubuokite 2 valandas (±5 min.) 2–8 °C temperatūroje (plokštelės nejudinkite).

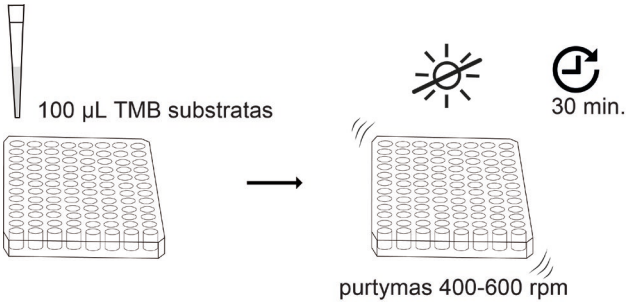
9. Nuimkite plokštelės sandariklį. Ištuštinkite duobutes ir tris kartus išplaukite, naudodami ne mažiau kaip 300 µL šalto! (2–8 °C) plovimo buferio vienoje duobutėje. Ištuštinkite šulinukus ir tvirtai patapšnokite plokštelę ant sugerenčio popieriaus.



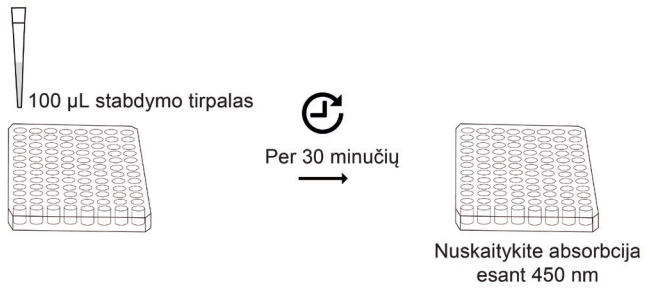

10. Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 100 µL TMB substrato tirpalo (atšildyto iki kambario temperatūros).

11. Uždenkite plokštę plokštelės sandarikliu, apsaugokite plokštę nuo šviesos ir inkubuokite ant lėkštelės purtyklės, nustatytos 400–600 rpm., 18–28 °C temperatūroje 30 ± 2 min.




12. Į visus šulinėlius įpilkite 100 µL stop tirpalo. Pipetės antgaliu pašalinkite oro burbuliukus. Per 30 minučių pereikite prie 13 veiksmo.

13. Mikrotitravimo plokštelės skaitytuvu nuskaitykite absorbciją esant 450 nm.




## KOKYBĖS KONTROLĖ

Norint sėkmingai naudoti gaminį, būtina gerai suprasti šią naudojimo instrukciją. Patikimi rezultatai bus gauti tik naudojant tikslius laboratorinius metodus ir tiksliai laikantis šios naudojimo instrukcijos.
BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA rinkinyje yra trys kontrolės: neigiama, žema ir vidutinė kontrolė. Kontrolės turi priskirtus verčių diapazonus (% Santykio), nurodytus su kiekvienu rinkiniu pateiktame KK duomenų lape. Norint gauti tinkamus rezultatus, kontroliniai matavimai turi būti nurodytose verčių intervaluose.
Be rinkinio kontrolės, vidinei kokybės kontrolei rekomenduojame naudoti serumo telkinius.
Kalibratoriui rekomenduojama minimali $OD_{450nm}$ vertė 1.2.
Veikimo charakteristikos turi neviršyti nustatytų ribų. Jei tyrimo atlikimas neatitinka nustatytų ribų, o pakartojimas pašalino technikos klaidas, patikrinkite šias problemas: i) temperatūros kontrolę (3-9 veiksme naudojami reagentai laikomi 2-8 °C temperatūroje) ii) termometrų pipetavimo ir laiko matavimo prietaisų tikslumą; iii) ELISA skaitytuvo nustatymus; iv) reagentų galiojimo laikus; v) laikymo ir inkubavimo sąlygas; vi) TMB substrato tirpalo spalvą (turėtų būti bespalvė); vii) vandens grynumą; viii) įsiurbimo ir plovimo metodus.

## STANDARTIZAVIMAS IR METROLOGINIS ATSEKAMUMAS

Nėra tarptautiniu ar nacionaliniu mastu pripažintų etaloninių medžiagų ar etaloninių matavimo procedūrų antigangliozidų ar -MAG antikūnams serumo mėginiuose. BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA yra standartizuotas pagal viduje nustatytą etaloninę medžiagą. Kalibratoriaus reikšmės yra priskiriamos pagal vertės perdavimo protokolą (2 nuoroda), kad būtų užtikrintas metrologinis atsekamumas, ir nurodomos savavališkais „% Santykio“ vienetais.
Nustatyta, kad produkto kalibratorių bendros neapibrėžties 95% pasikliautinasis intervalas yra 29,3% IgG antikūnams ir 37,6% IgM antikūnams.

## TYRIMO REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

1. Kiekvienoje duobutėje (kalibratoriaus, kontrolinės medžiagos ir mėginių) užrašykite absorbciją (OD) esant 450 nm.
2. Jei buvo atlikti keli kalibravimo ir kontroliniai matavimai, apskaičiuokite verčių vidurkį.

Rezultatai išreiškiami kaip mėginių absorbcijos ir kalibratoriaus (vidutinės) absorbcijos santykis.

**Izotipų mišinys**

$$\text{\% santykis} : \frac{\text{mėginių ar kontrolinių medžiagų absorbcija}}{\text{kalibratoriaus absorbcija}} \times 200$$

**IgG ir IgM izotipai**

$$\text{\% santykis:} \frac{\text{mėginių ar kontrolinių medžiagų absorbcija}}{\text{kalibratoriaus absorbcija}} \times 100$$

Daugumoje mikroplokštelių skaitytuvų yra programos, skirtos rezultatams apskaičiuoti kaip % santykį.

*Pastaba: 7 ir 8 lentelėse pateikti rezultatai yra pavyzdžiai ir pateikiami tik demonstravimo tikslais.*

## APRIBOJIMAI

- Didelio procentinio santykio rezultatai (> 100%) atskiriems gangliozidams gali sukelti kryžminį reaktyvumą su kitais gangliozidais tame pačiame mėginyje. Kryžminis reaktyvumas paprastai rodo didelį skirtumą tarp tyrimų. Todėl rezultatų aiškinimas turėtų būti atliekamas tik kartu su ekspertu / specialistu.
- Dėl autoimuninių antikūnų polireaktyvumo ir geografinio paplitimo skirtumų tyrimo rezultatus turėtų naudoti tik ekspertas/specialistas klinikiniam neuropatijos aiškinimui paremti, atsižvelgiant į paciento klinikinį vaizdą (3 nuoroda).
- Šis testas nebuvo patvirtintas plazmaferezei.
- Intraveniniai imunoglobulinai (IVIg) gali turėti įtakos tyrimo rezultatams.

## ATSKAITINIAI INTERVALAI IR RIBINĖ VERTĖ

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA atskaitos intervalas buvo nustatytas pagal CLSI C28-A3, naudojant 120 serumo mėginių iš savarankiškai deklaruotų sveikų asmenų. Anti-gangliozidų ir anti-MAG antikūnų pasiskirstymo dažnis normalių kraujo donorų organizme buvo suskirstytas į titrų kategorijas: neigiamas (<30% santykis), pilkoji zona (30-50% santykis) ir teigiamas (>50% santykis). Rezultatai apibendrinti 9 lentelėje. Teigiamumo ribinė vertė yra 50% santykis.

## REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

| Antigenas | IgG/IgM mišinys | | |
|---|---|---|---|
| | Vertės (% santykis) | | |
| | <30 | 30-50 | >50 |
| HNK-1 | Neigiamas | Žr. anotaciją */** | Žr. anotaciją */** |
| GM1 | | Tirkite iš naujo vėliau | Teigiamas |
| GT1a | | | |
| GD1a | | | |
| GD1b | | | |
| GQ1b | | | |

3 lentelė

| Antigenas | IgG | | |
|---|---|---|---|
| | Vertės (% santykis) | | |
| | <30 | 30-50 | >50 |
| HNK-1 | Neigiamas | Žr. anotaciją * | Žr. anotaciją * |
| GM1 | | Tirkite iš naujo vėliau | Tegiamas |
| GT1a | | | |
| GD1a | | | |
| GD1b | | | |
| GQ1b | | | |

4 lentelė

| Antigenas | IgM | | |
|---|---|---|---|
| | Vertės (% santykis) | | |
| | <30 | 30-50 | >50 |
| HNK-1 | Neigiamas | Žr. anotaciją ** | Teigiamas (žr. anotaciją**) |
| GM1 | | Tirkite iš naujo vėliau | Tegiamas |
| GT1a | | | |
| GD1a | | | |
| GD1b | | | |
| GQ1b | | | |

5 lentelė

Tyrimo rezultatai turėtų būti interpretuojami kartu su informacija, gauta iš klinikinio paciento įvertinimo ir kitų diagnostinių procedūrų.
* MAG neuropatija dažniausiai siejama su IgM izotipo anti-MAG antikūnų buvimu (4 nuoroda).
** Rezultatai nuo 30 iki 50% (pilka zona) arba > 50% (teigiami) HNK-1, gauti naudojant mišinį arba fermentinį žymenį IgM, gali būti pakartotinai tiriami naudojant anti-MAG Antibodies ELISA (EK-MAG).

## VEIKIMO CHARAKTERISTIKOS

### Metodo palyginimas

### BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA su anti-MAG Antibodies ELISA

Metodų palyginimo tyrimas atliktas pagal CLSI gaires EP09-A3 ir EP12-A2. Šimtas dvidešimt du (122) mėginiai buvo išmatuoti naudojant 2 BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA ir 2 anti-MAG Antibodies ELISA partijas. Buvo nustatytas diagnostinis (kappa) suderinamumas, neigiamas procentinis suderinamumas ir teigiamas suderinamumas susitarimas. Suderinamumai pateikti 10 lentelėje.

### Laboratorinis tikslumas

**Skirta antigangliozidams: 5,7 – 13,2% CV**
**Skirta anti-MAG: 14,4 – 36,5% CV**

Laboratorijos tikslumas buvo nustatytas pagal CLSI gairę EP05-A3, naudojant standartizuotą 20 dienų x 2 paleidimų x 2 pakartojimų tyrimo planą. Buvo ištirti trys (3) jungtiniai paciento serumo mėginiai. Rezultatai apibendrinti 11 lentelėje.

### Atkuriamumas

**Skirta antigangliozidams: 7,7 – 19,1% CV**
**Skirta anti-MAG: 23,5 – 33,2% CV**

Atkuriamumas buvo nustatytas pagal CLSI gairę EP05-A3, naudojant 3 prietaisus / partijas / operatorius x 5 dienas x 5 pakartojimus, kurie sudaro tyrimo planą. Buvo ištirti trys (3) jungtiniai paciento serumo mėginiai. Rezultatai apibendrinti 12 lentelėje.

**Tuščioji riba (LoB) ≤ aptikimo riba (LoD): ≤30% santykis**
LoB ir LoD buvo nustatyti pagal CLSI gairę EP17-A2, naudojant neparametrinę analizę. Rezultatai apibendrinti 13 lentelėje.

### Didelės dozės “kablio” efektas

Jokių apribojimų dėl didelės dozės kablio efekto matavimo diapazonui nepastebėta.

### Kryžminis reaktyvumas

Sistemingo kryžminio reaktyvumo nepastebėta mėginiams iš pacientų, sergančių įvairiomis autoimuninėmis ligomis (14 lentelė) ir iš pacientų, sergančių kitais neurologiniais sutrikimais (15 lentelė).

## KLINIKINIS VEIKIMAS

Klinikinis efektyvumas buvo įvertintas apibendrinant recenzuojamos mokslinės literatūros analizę. Šeši (6) tyrimai buvo skirti BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA klinikiniam veikimui diagnozuojant autoimunines periferines neuropatijas (nuoroda 5-10). Analizės rezultatai ir tyrimo detalės pateikti atitinkamai 6 ir 16 lentelėse.

| | |
|---|---|
| N periferinė neuropatija | 201 (102 vaikų GBS, 14 CIDP, 44 GBS, 41 anti-MAG neuropatija) |
| N kontrolės | 493 (104 DC, 254 NC, 135 HC) |
| Jautrumas (95% CI) | 68,1% (39,6 – 87,5%) |
| Specifiškumas (95% CI) | 88,0% (72,3 – 95,3%) |
| ROC AUC | 0,85 |

6 lentelė

GBS, Guillain-Barré sindromas; DC, ne neurologinių ligų kontrolė; NC, neurologinė kontrolė; HC, sveika kontrolė; CIDP, lėtinė uždegiminė demielinizuojanti polineuropatija; CI, pasikliautinasis intervalas; ROC AUC, plotas po imtuvo veikimo charakteristikos kreive

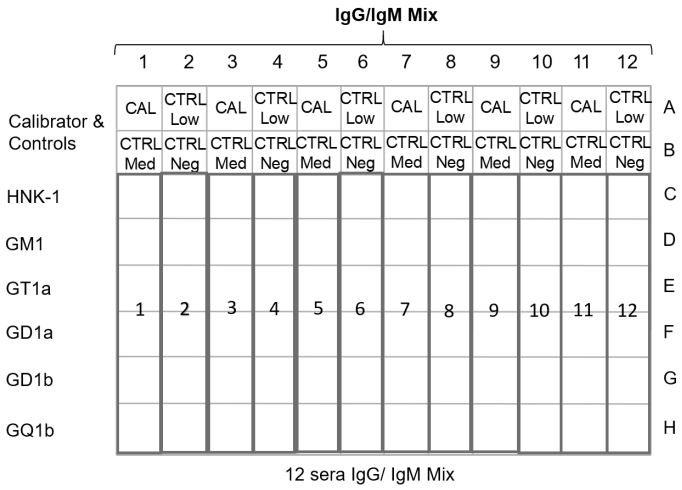
## TRUKDŽIASIOS MEDŽIAGOS

Tyrimo jautrumas geriamiems ir injekciniams vaistams, taip pat endogeninėms medžiagoms buvo įvertintas pagal CLSI gairę EP07-A3. Rezultatų paklaida ≥ ± 20% Santykis buvo laikoma trukdžiu.

Nebuvo nustatyta jokių trukdžių šioms medžiagoms iki nurodytų koncentracijų: intraveninis imunoglobulinas (20 mg/mL), rituksimabas (3 mg/mL), kladribinas (273 ng/mL), interferonas alfa-2a (49,5 ng/mL), gabapentinas (26,7 µg/mL), ibuprofenas (0,22 mg/mL), chlorambucilis (1,96 µg/mL), prednizonas (99 ng/mL), prednizolonas (1,2 µg/mL), reumatoidinis faktorius (2340 IU/mL), hemoglobinas (10 mg/mL), hemolizatas (10 mg/mL), trigliceridas (15 mg/mL), konjuguotas bilirubinas (20 µg/mL), nekonjuguotas bilirubinas (150 µg/mL).

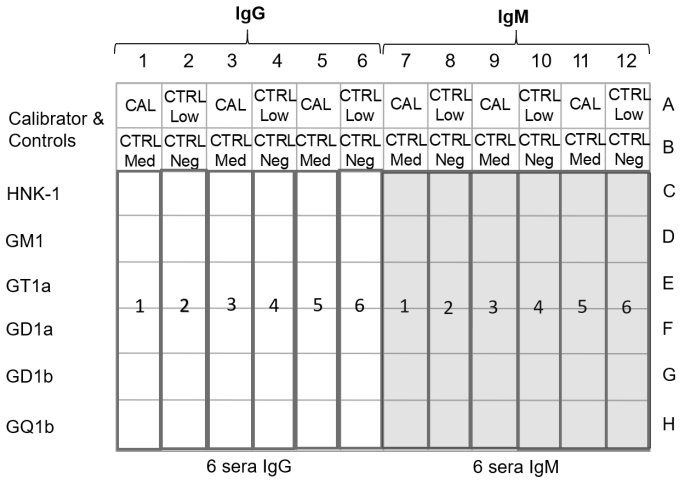
## LENTELĖS IR PAVEIKSLAI

### Mikrotitravimo plokštelės nustatymas: IgG/IgM-mišinio žymuo




1A paveikslas: ≤ 24 serumai / rinkinyje (2 MP / rinkinyje)

### Mikrotitravimo plokštelės nustatymas: IgG ir IgM žymuo




2B paveikslas: 2 profiliai / serume, ≤ 12 serumai / rinkinyje (2 MP / rinkinyje)

### Rezultatų pavyzdžiai

#### A IgG/IgM-mišinio žymuo

| B-GCO-ELGM | Absorbcija (OD450) | Santykis [%] |
|---|---|---|
| Kalibratorius<br><br>Kalibratoriaus vidurkis | 2,179<br>2,477<br>2,328 | 100 |
| Vidutinė kontrolė<br><br>Vidutinės kontrolės vidurkis | 1,737<br>1,891<br>1,814 | 78 |
| Žema kontrolė<br><br>Žemos kontrolės vidurkis | 0,662<br>0,460<br>0,561 | 24 |
| Neigiama kontrolė<br><br>Neigiamos kontrolės vidurkis | 0,044<br>0,046<br>0,045 | 2 |
| Mėginys 1<br>HNK-1 | 0,234 | 10 |
| Mėginys 1<br>GM1 | 0,543 | 23 |
| Mėginys 1<br>GT1a | 1,976 | 85 |
| Mėginys 1<br>GD1a | 0,621 | 27 |
| Mėginys 1<br>GD1b | 0,734 | 32 |
| Mėginys 1<br>GQ1b | 2,573 | 111 |

7 lentelė

#### B IgG ir IgM žymuo

| Fermentinis žymuo | Absorbcija (OD450) | | Santykis [%] | |
|---|---|---|---|---|
| B-GCO-ELG/<br>B-GCO-ELM | IgG | IgM | IgG | IgM |
| Kalibratorius<br><br>Kalibratoriaus vidurkis | 2,488<br>2,446<br>2,467 | 2,411<br>2,201<br>2,306 | 100 | 100 |
| Vidutinė kontrolė<br><br>Vidutinės kontrolės vidurkis | 1,879<br>1,987<br>1,933 | 1,734<br>1,818<br>1,776 | 78 | 77 |
| Žema kontrolė<br><br>Žemos kontrolės vidurkis | 0,452<br>0,716<br>0,584 | 0,501<br>0,609<br>0,555 | 24 | 24 |
| Neigiama kontrolė<br><br>Neigiamos kontrolės vidurkis | 0,045<br>0,037<br>0,041 | 0,048<br>0,042<br>0,045 | 2 | 2 |
| Mėginys 1<br>HNK-1 | 0,423 | 0,621 | 17 | 27 |
| Mėginys 1<br>GM1 | 2,001 | 2,102 | 81 | 91 |
| Mėginys 1<br>GT1a | 0,521 | 0,237 | 21 | 10 |
| Mėginys 1<br>GD1a | 1,984 | 0,821 | 80 | 36 |
| Mėginys 1<br>GD1b | 0,473 | 1,923 | 19 | 83 |
| Mėginys 1<br>GQ1b | 0,094 | 0,911 | 4 | 40 |

8 lentelė

## LENTELĖS IR PAVEIKSLAI

### Atskaitos intervalas

| Analitė | % normalių kraujo donorų kategorijose | | | Atskaitos riba |
|---|---|---|---|---|
| | <30 % santykis | 30 - 50 % santykis | >50 % santykis | (90% CI) |
| 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]<br>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]<br>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* moterų progrūpis. *M* vyrų pogrūpis

9 lentelė

### Anti-MAG antikūnų palyginimo metodai

| Apibūdinimas | N | Kappa agreement | | NPA | | PPA | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Vertė | 95% CI | Vertė | 95% CI | Vertė | 95% CI |
| EK-GCM IgM su 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 mišinys su EK-MAG | 122 | 0,87 | 0,78 - 0,96 | 97,0% | 89,5% - 99,6% | 89,3% | 78,1%- 96,0% |

10 lentelė

NPA: neigiamas procentinis suderinamumas
PPA: teigiamas procentinis suderinamumas
CI: patikimumo intervalas

### Laboratorinis tikslumas

| Mėginio aprašymas | | | Laboratorinis tikslumas | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Analitė | Fermento etiketė (izotipas) | Numatyta kategorija [% santykis] | N | Vidurkis [% santykis] | SD [% santykis] | CV [%] |
| 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 |

11 lentelė

### Atkuriamumas

| Mėginio aprašymas | | | Atkuriamumas | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Analitė | Fermento etiketė (izotipas) | Numatyta kategorija [% santykis] | N | Vidurkis [% santykis] | SD [% santykis] | CV [%] |
| 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 |

12 lentelė

### LoD ir LoB

| Analitė | LoB [% santykis] | LoD [% santykis] |
|---|---|---|
| Anti-GM1 IgM Ab | 5 | 21 |
| Anti-GM1 IgG Ab | 6 | 15 |
| Anti-MAG IgM Ab | 12 | 26 |
| Anti-MAG IgG/IgM mišinys Ab | 14 | 27 |
| Anti-GQ1b IgM Ab | 3 | 17 |
| Anti-GQ1b IgG Ab | 8 | 18 |

13 lentelė

### Kryžminis reaktyvumas

| Priskirtas antikūnas | Diagnozė | # |
|---|---|---|
| Anti-neutrofilų citoplazminis antikūnas (ANCA) | Vaskulitas | 3 |
| | Kiti (ANCA teigiami pavyzdžiai) | 10 |
| Antibranduoliniai antikūnai (ANA) | Sisteminė raudonoji vilkligė | 5 |
| | Reumatoidinis artritas | 9 |
| | Sjogreno sindromas | 6 |
| | Kiti (ANA teigiami mėginiai) | 3 |
| Antikūnai prieš tiroglobulinus (anti-Tg) | Autoimuninis tiroiditas | 5 |
| Antikūnai prieš ribonukleoproteinus | Mišri jungiamojo audinio liga | 1 |
| Anti-GQ1b, anti-GM1, anti-GD1b | Autoimuninės periferinės neuropatijos | 1 |
| Antikūnai prieš acetilcholiną ir specifinę tirozino kinazę | Myasthenia gravis | 7 |

14 lentelė

| Periferinės neuropatijos | # |
|---|---|
| Alkoholikas | 1 |
| Diabetikas | 5 |
| **Periferinės neuropatijos imitacijos sutrikimai** | **#** |
| Amiotrofinė lateralinė sklerozė (ALS) | 15 |
| Sarkoidozė | 4 |
| Waldenstrom makroglobulinemija (WM) | 4 |
| Chagaso liga | 5 |

15 lentelė

## LENTELĖS IR PAVEIKSLAI

### Klinikinis veikimas

| Tyrimas | Teigiamos kontrolės (atvejai) | Neigiamos kontrolės | Epitopas | Jautrumas | Specifiškumas |
|---|---|---|---|---|---|
| Hashemilar et al., 2014 | Pediatrinis GBS (n = 45) | DC (n = 35) | GM1 | 0,51 | 0,89 |
| | | | GQ1b | 0,56 | 0,74 |
| Sharma et al., 2011 | Pediatrinis 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-neuropatija (n = 41) | NC (n = 112)<br>HC (n = 6) | HNK-1 (MAG) | 0,98 | 0,99 |

16 lentelė

GBS, Guillain-Barré sindromas; DC, ne neurologinių ligų kontrolė; NC, neurologinė kontrolė; HC, sveika kontrolė; MFS, Miller Fisher sindromas; CIDP, lėtinė uždegiminė demielinizuojanti polineuropatija

# BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA

**Iš anksto padengta mikrotitravimo plokštelė**

↓ *plaukite 2 x su ≥300 µL (šaltu)! Plovimo buferiu*

**100 µL kalibratoriaus, kontrolių ar serumo mėginiai (1:50)**

↓ *inkubuokite 2 valandas (±5 min) esant 2-8 °C*
*plaukite 3 x su ≥300 µL (šaltu)! Plovimo buferiu*

**pridekite 100 µL fermentinio (-ių) žymens (-ų)**

↓ *inkubuokite 2 valandas (±5 min) esant 2-8 °C*
*plaukite 3 x su ≥300 µL (šaltu)! Plovimo buferiu*

**pridėkite 100 µL TMB substrato (aplinkos temperatūros)!**

↓ *inkubuokite 30 min (±2 min) esant 18-28 °C*
*ant plokštelės purtyklės ~400-600 rpm*

**pridėkite 100 µL stabdymo tirpalo (aplinkos temperatūros)!**

➡ **Nuskaitykite absorbciją esant 450 nm (per 30 minučių)**

## LAIKAS IKI REZULTATO GAVIMO: 4,5 VALANDOS

## NUORODOS


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).


## PAKEITIMAI

| Data | Versija | Pakeitimas |
|---|---|---|
| 2023-08-17 | A1 | Pakeiskita *Paskirtis* ir produkto pavadinimas<br>GM2 gangliozido pašalinimas ir GT1a gangliozido įvedimas<br>*Tyrimo principo* performulavimas su titrų kategorijomis neigiamas, pilka zona, teigiamas<br>Naujas reagentų naudojimo stabilumas<br>Atnaujintas skyrius *Įspėjimai ir atsargumo priemonės*<br>Skyrių *Mėginių paėmimas ir saugojimas*, *Tyrimo procedūra*, ir *Standartizavimas ir metrologinis atsekamumas* peržiūra<br>*Kokybės kontrolės* skyriaus pakeitimai<br>Skyriaus *Apribojimai* atnaujinimas<br>Skyrių *Referentiniai intervalai*, *Veikimo charakteristikos*, ir *Trukdančios medžiagos* peržiūra<br>Skyriaus *Klinikinis veikimas* įvedimas<br>Skyrių *Nuorodos* ir *Simboliai* peržiūra<br>Notifikuotos įstaigos numerio įtraukimas į CE ženklą – atitikties įvertinimo procedūra pagal IVDR 2017/746. Skyriaus *Simboliai* peržiūra |

## PRANEŠIMAS APIE ĮVYKIUS ES VALSTYBĖSE NARĖSE

Jei įvyko koks nors rimtas incidentas, susijęs su šiuo įrenginiu, nedelsdami praneškite gamintojui ir savo valstybės narės kompetentingai institucijai.

## PRISTATYMO ŽALA

Praneškite savo platintojui, jei gavote sugadintą produktą.

## SIMBOLIAI

BÜHLMANN naudoja simbolius ir ženklus, išvardytus ir aprašytus ISO 15223-1. Taip pat naudojami šie simboliai ir ženklai:

| Simbolis | Paaiškinimas |
|---|---|
| MP | Mikrotitro plokštelė |
| BUF WASH 10X | Plovimo buferio koncentratas (10x) |
| BUF INC | Inkubavimo buferis |
| CAL | Kalibratorius |
| CONTROL - | Neigiama kontrolė |
| CONTROL L | Žema kontrolė |
| CONTROL M | Vidutinė kontrolė |
| EL IgG | Fermentinis žymuo IgG |
| EL IgM | Fermentinis žymuo IgM |
| EL MIX | Fermentinis žymuo IgG/IgM mišinys |
| SUBS TMB | TMB substratas |
| SOLN STOP | Stop tirpalas |

CE 0123