



BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA

ar enzīmu markieriem IgG/IgM Mix, IgG un IgM

Anti-ganglioziņu un -MAG antivielu
noteikšana ar ELISA
(HNK-1 ("MAG"), GM1, GT1a, GD1a, GD1b un GQ1b)

In vitro diagnostikai

EK-GCM 2 x 96 testi

Publicēšanas datums: 2023-08-17
Versija A1



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

LATVIKI

PAREDZĒTAIS LIETOJUMS

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA ir *in vitro* diagnostikas tests daļēji kvantitatīvai IgG un/vai IgM antivielu noteikšanai pret izraudzītiem nervu antigēniem/epitopiem seruma paraugos. Analīzes rezultātus var izmantot autoimūno perifēro neiropatiju diagnozes apstiprināšanai kopā ar citiem klīniskiem un laboratoriskiem datiem.

Tikai lietošanai laboratorijā.

PAREDZĒTAIS PIELIETOJUMS

Komplektā iekļautie trīs enzīmu markieri ļauj izmantot trīs dažādus testēšanas algoritmus:

1. Testēšana ar IgG/IgM konjugātu maisījumu (turpmāk tekstā – maisījumu) ļauj noteikt, vai ir antivielas, kas liecina par autoimūnu neiropatiju.
2. Testēšana ar atsevišķiem IgG un/vai IgM konjugātiem ļauj noteikt antivielu izotipu.
3. Laboratorijas apstrādei sākotnējam parauga skrīnings, izmantojot maisījumu (1. iespēja), ja nepieciešams, var sekot maisījuma pozitīvo paraugu diferenciācija, izmantojot atsevišķus IgG un IgM konjugātus (2. iespēja).

PĀRBAUDES PRINCIPS

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA ļauj noteikt gangliozīdu un ar mielīnu saistīto glikoproteīna (MAG) antivielas serumā. Mikrotitrēšanas plate ir pārklāta ar gangliozīdiem: GM1, GT1a, GD1a, GD1b, GQ1b un ķīmiski sintezētu MAG glikoproteīna HNK-1 epitopu (1. atsauce).

Mikrotitrēšanas plates iedobēs pievieno pacientu serumus, kontroles un kalibratoru. Pēc 2 stundu inkubācijas 2-8 °C temperatūrā un mazgāšanas posmiem ar mārrutku peroksidāzi (HRP) konjugētās noteikšanas antivielas (anti-IgG/IgM, anti-IgG, anti-IgG, anti-IgM) nosaka antigangliozīdu un/vai anti-MAG antivielas, kas ir piesaistītas imobilizētajiem gangliozīdiem vai HNK-1 uz plates. Pēc vēl 2 stundu ilgas inkubācijas un turpmākajiem mazgāšanas posmiem pievieno hromogēno HRP substrātu, tetrametilbenzidīnu (TMB) (veidojas zila krāsa), kam seko apturēšanas reakcija (mainās uz dzeltenu krāsu). Absorbciju mēra pie 450 nm.

Izmērītā absorbceja ir proporcionāla attiecīgajā paraugā esošo antivielu titram. Antivielu titrus izsaka kā kalibrētāja attiecību %, un tos var iedalīt titru kategorijās (negatīvs, pelēkā zona, pozitīvs).

NODROŠINĀTIE REAGENTI UN SAGATAVOŠANA

Reāgenti	Daudzums	Kods	Sagatavošana
Mikrotitrēšanas plate iepriekš pārklāts ar gangliozīdiem un HNK-1	2 x12 x 8 iedobes sloksnes ar rāmi	B-GCM- MP	Gatavs lietošanai
Plašu hermētīkis	6 gabali		
Mazgāšanas buferšķīdums Koncentrāts (10x) ar konservantiem	2 pudeles x 100 mL	B-GCO- WB	Atšķaida ar 900 ml dejonizēta ūdens
Inkubācijas buferšķīdums ar konservantiem	1 pudele x 100 mL	B-GCO-IB	Gatavs lietošanai

Reāgenti	Daudzums	Kods	Sagatavošana
Kalibrators liofilizēts ar konservantiem	1 flakons	B-GCO-CA	Pievienojiet 1,5 mL inkubācijas buferšķīduma
Kontrole negatīvā, zemā un vidējā ¹ liofilizēts ar konservantiem	3 flakoni	B-GCO- CONSET	Pievienojiet 1,5 mL inkubācijas buferšķīduma
Enzīmu markieru IgG/IgM maisījums anti-cīlvēka IgG un IgM antivielas, kas konjugētas ar HRP bufera matricā ar konservantiem	2 flakoni x 11 mL	B-GCO- ELGM	Gatavs lietošanai
Enzīma markēris IgG anti-cīlvēka IgG antivielas, kas konjugēta ar HRP bufera matricā ar konservantiem	1 flakons x 11 mL	B-GCO- ELG	Gatavs lietošanai
Enzīma markēris IgM anti-cīlvēka IgM antivielas, kas konjugēta ar HRP bufera matricā ar konservantiem	1 flakons x 11 mL	B-GCO- ELM	Gatavs lietošanai
TMB substrāts TMB citrāta buferšķīdumā	2 flakoni x 11 mL	B-TMB	Gatavs lietošanai
Stop šķīdums 0.25 M sērskābe	2 flakoni x 11 mL	B-STS	Gatavs lietošanai Korozīvs līdzeklis

1. tabula

¹ Kontroles satur vairākus specifiskus anti-GM1 antivielu līmeņus. Skatiet papildu kvalitātes kontroles datu lapu, lai uzzinātu faktisko vidējo OD un % attiecību.

REAGENTU UZGLABĀŠANA UN DERĪGUMA TERMINĀ

Aizzīmogoti/neatvērti reāgenti
Uzglabāt 2-8 °C temperatūrā. Neizmantojet reāgentus pēc derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz etiķetēm.
Atvērti/sagatavoti reāgenti
Mikrotitrēšanas plate
Atšķaidīts mazgāšanas buferšķīdums
Inkubācijas buferšķīdums
Enzīmu markieri
TMB substrāts
Kalibrators
Kontroles
Stop šķīdums

Uzglabāt līdz 6 mēnešiem 2-8 °C temperatūrā.

2. tabula

NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NAV NODROŠINĀTI

- Mikropipetes ar vienreizlietojamiem uzgaļiem: 10 µL, 20 µL, 100 µL un 1000 µL pipetes
- Vienreizlietojamās polistirola vai polipropilēna mēģenes paraugu atšķaidījumu sagatavošanai
- 1000 mL cilindrs mazgāšanas buferšķīduma atšķaidīšanai

- Mikrotitrēšanas plašu mazgātājs
- Blotēšanas papīrs
- Mikrotitrēšanas plates kratītājs
- Mikrotitrēšanas plates lasītājs absorbcijas mērišanai pie 450 nm

BRĪDINĀJUMI UN PIESARDZĪBAS PASĀKUMI

Drošības pasākumi

- Šī komplekta kalibrators un kontrolierīces satur cilvēka izcelsmes sastāvdaļas. Lai gan HBV, HCV un HIV1/2 testi ir negatīvi, ar reaģentiem jārīkojas tā, it kā tie varētu pārnēsāt infekcijas, un ar tiem jārīkojas saskaņā ar labu laboratorijas praksi (GLP), izmantojot atbilstošus piesardzības pasākumus.
- Šis komplekts satur sastāvdaļas, kas klasificētas saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1272/2008:
 - Stop šķidums satur sērskābi (konc. 2,5 - 5%), tāpēc reaģenti var izraisīt ādas kairinājumu (H315), nopietnu acu kairinājumu (H319) un koroziju ar metāliem (H290).
 - Kalibrētājs, kontroles un enzīmu markieri satur 2-metil-4-izotiazolin-3-onu hidrochlorīdu (koncentrācija $\geq 0,0015\%$), tāpēc reaģenti var izraisīt alerģiskas ādas reakcijas (H317).
 - Inkubācijas buferšķidums un mazgāšanas buferšķidums satur gentamicīna sulfātu, tāpēc reaģenti var izraisīt alerģisku ādas reakciju (H317).
- Izvairieties no reaģentu saskares ar ādu, acīm vai glotādu. Ja notiek saskare, nekavējoties mazgāt ar lielu daudzumu ūdens, pretējā gadījumā var rasties kairinājums / apdegumi.
- Reaģenti un ķīmikālijas jāapstrādā kā bīstamie atkritumi saskaņā ar valsts bioloģiskās drošības vadlīnijām vai noteikumiem.

Tehniskie piesardzības pasākumi

- Pirms testa veikšanas rūpīgi izlasiet instrukcijas. Ja reaģenti tiek nepareizi atšķaidīti, modifcēti vai uzglabāti apstākļos, kas nav aprakstīti šajā lietošanas instrukcijā, tas negatīvi ietekmē testa veiktspēju.

ELISA procedūra

Reaģentu temperatūra

- Pirms analīzes procedūras sākšanas sagatavojet reaģentus 3.-9. posmā izmantotajiem reaģentiem jābūt aukstiņiem (2-8 °C), un arī pipetēšanas un mazgāšanas laikā tiem jābūt aukstiņiem. Ieteikums: sagatavo mazgāšanas buferšķidumu dienu pirms analīzes veikšanas un ievieto to ledusskapī uz nakti.
- Visus mazgāšanas soļus veikt ar aukstu (2-8 °C) mazgāšanas buferšķidumu.
- Analīzes procedūras sākumā TMB substrātu un Stop šķidumu uzsildīt līdz istabas temperatūrai (18-28 °C).

Mazgāšanas posmi

- 3., 6. un 9. mazgāšanas posms ir ļoti svarīgs, lai likvidētu ražošanas procesā radušās atliekas un/vai potenciāli nesaistītās antivielas iedobēs.
- Ieteicams izmantot automātisko mazgāšanas mašīnu, kas darbojas "plašu režīmā", t. i., katrs procesa posms

(dozēšana / aspirācija) tiek veikts visām sloksnēm secīgi, pirms instruments turpina nākamo mazgāšanas ciklu.

- Pārliecinieties, ka pēc pēdējā mazgāšanas cikla visas iedobes ir pilnīgi tukšas.

Substrāta inkubēšana

- 11. solis: inkubācijas laikā sakratiet mikrotitrēšanas plates ar substrātu. Atkarībā no plašu kratītāja modeļa ieteicams izvēlēties 400-600 apgriezeni minūtē. Šķidumam ir jāpārvietojas iedobēs, bet tas nedrīkst pārplūst.

Komplekta sastāvdaļas

- Sastāvdaļas nedrīkst izmantot pēc derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz etiķetēm.
- Nesajaukt dažādas reaģentu partijas.
- Jānodrošina, lai starp reaģentiem, paraugiem vai iedobēm nenotiku savstarpēja piesārņošana.
- Mikroiedobes nevar izmantot atkārtoti.

PARAUGU SAVĀKŠANA UN UZGLABĀŠANA

Procedūrai nepieciešams attiecīgi $<0,1 \text{ mL}$ asiņu vai $<50 \text{ μL}$ seruma.

Nemiet asinis parastās venipunktūras mēgenēs bez jebkādām piedevām un izvairieties no hemolizes. Veikt seruma sagatavošanu saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Dekantējiet serumu.

Seruma paraugus var uzglabāt 2-8 °C temperatūrā līdz astoņām nedēļām, 28 °C temperatūrā līdz vienai nedēļai un ≤ -20 °C temperatūrā līdz 16 nedēļām. Sasaldēti paraugi pirms lietošanas jāatkausē un rūpīgi jāsamaisa, viegli pagriezot vai apgrīežot.

Pirms sasaldēšanas ieteicams sagatavot seruma paraugu alikvotas, lai izvairītos no atkārtotiem sasaldēšanas/atkausēšanas cikliem.

TESTĒŠANAS PROCEDŪRA

Ir divas iespējas:

- (1) Jauktu izotipu (IgG un IgM) noteikšana: 7. solī pievienojiet enzīma markieru maisījumu.
- (2) IgG vai IgM izotipu noteikšana: 7. solī pievienot vai nu enzīma markieri IgG vai enzīma markieri IgM.

Piezīme: TMB substrāta šķidumu uzsildīt līdz istabas temperatūrai (18-28 °C).

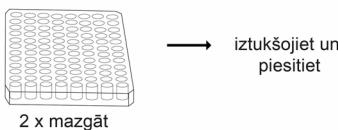
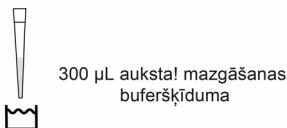
1. Atšķaidiet paraugus 1:50 ar inkubācijas buferšķidumu. Izmantojet, piemēram, 20 μL seruma + 980 μL auksta! (2-8 °C) inkubācijas buferšķidumu. Rūpīgi sajauciet (sakratot) un pirms pipetēšanas atstājet atšķaidītos paraugus, kā arī sagatavoto kalibratoru un kontroles 30 minūtes 2-8 °C temperatūrā (skatīt 4.a un 4.b soli).

2. Sagatavojet plates rāmi ar pietiekamu joslu skaitu, lai testētu vajadzīgo skaitu kalibratoru, kontroļu un paraugu. Nonemiet liekās joslas no rāmīša un nekavējoties ievietojiet to atpakaļ folijas maisījā kopā ar desikanta iepakojumiem. Uzglabāt ledusskapī.

Piezīme: 3.-9. posmā izmantojet aukstus reaģentus.

3. Izskalojiet iedobes divas reizes, izmantojot vismaz 300 μL auksta! (2-8 °C) skalošanas buferšķiduma uz

iedobi. Iztukšojiet iedobes un stingri piesitiet plāksnīti pie blotinga papīra, lai pilnībā noņemtu atlikušo šķidrumu.



→ iztukšojiet un
piesitet

2 x mazgāt

Piezīme: nekavējoties pārejiet uz nākamajiem soļiem.

4a. Ar pipeti iepiliniet 100 µL kalibratora iedobē A1 (skatīt 1.A attēlu 1. variantam vai 1.B attēlu 2. variantam).

4b. Ar pipeti iepiliniet 100 µL vidējas kontroles parauga B1 iedobē, zemas kontroles parauga A2 iedobē un negatīvas kontroles parauga B2 iedobē (sk. 1A vai 1B attēlu).

Piezīme 1. variantam: Ja vienā piegājienā izmanto vairāk nekā trīs joslas, kalibrētāju un kontroles var testēt dubultā (sk. 1.A attēlu).

Piezīme 2. variantam: IgG un IgM izotipiem kalibrētājs un kontrole jāveic atsevišķi (skatīt 1.B attēlu).

4c. Ar pipeti iepiliniet 100 µL atšķaidīta 1. parauga iedobēs C1-H1 (skatīt 1.A vai 1.B attēlu).

4d. Ar pipeti iepiliniet 100 µL atšķaidīta 2. parauga iedobēs C2-H2 (skatīt 1.A vai 1.B attēlu).

4e. Ar pipeti iepiliniet 100 µL atšķaidītu paraugu 3-24 (1. variantam) vai 3-12 (2. variantam) nākamajās iedobēs (sk. 1.A vai 1.B attēlu).

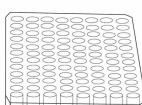
Piezīme 2. variantam: atkārtojet 1.-12. parauga pipetēšanu tādā pašā secībā atlikušajās iedobēs, lai veiktu testēšanu ar otru izotipu.

5. Pārklājiet plati ar plākšņu hermētīki un inkubējiet 2 stundas (± 5 min) 2-8 °C temperatūrā (plati nedrīkst kratīt).

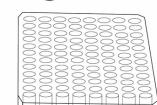
6. Noņemiet plates hermētīki. Iztukšojiet iedobes un mazgājiet trīs reizes, izmantojot vismaz 300 µL auksta! (2-8 °C) skalošanas buferšķiduma uz iedobi. Iztukšojiet iedobes un stingri piesitet plāksni pie blotēšanas papīra, lai pilnībā noņemtu mazgāšanas buferšķidumu.

100 µL kalibrators /
100 µL kontroles /
100 µL paraugi

2 h
@ 2-8 °C



→



→ 3 x mazgāt
1 x iztukšojiet un
piesitet

Iespēja Nr. 1: jaukta izotipa noteikšana

7. Pievienojiet iedobēs 100 µL maisījuma.

Iespēja Nr. 2: IgG vai IgM izotipu noteikšana

7'. Attiecīgajās iedobēs pievieno 100 µL vai nu ar enzīmu markieri IgG, vai IgM (sk. 1.B attēlu).

8. Pārklājiet plati ar plates hermētīki un inkubējiet 2 stundas (± 5 min) 2-8 °C temperatūrā (plati nedrīkst kratīt).

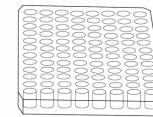
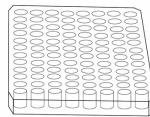
9. Noņemiet plates hermētīki. Iztukšojiet iedobes un mazgājiet trīs reizes, izmantojot vismaz 300 µL auksta!

(2-8 °C) skalošanas buferšķiduma uz iedobi. Iztukšojiet iedobes un stingri piesitet plāksnīti pie blotēšanas papīra.

Iespēja Nr. 1

100 µL enzīmu
markēru maisījums

2 h
@ 2-8 °C

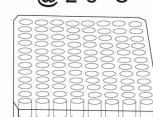


→ 3 x mazgāt
1 x iztukšojiet un
piesitet

Iespēja Nr. 2

100 µL enzīma
markēra IgG vai
100 µL enzīma
markēral IgM

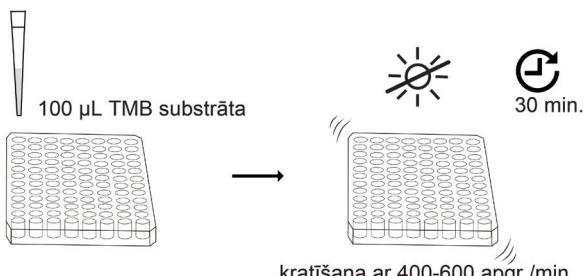
2 h
@ 2-8 °C



→ 3 x mazgāt
1 x iztukšojiet un
piesitet

10. Katrā iedobē pievieno 100 µL TMB substrāta šķiduma (uzslidīts līdz istabas temperatūrai).

11. Plati pārklājiet ar plates hermētīki, pasargājiet plati no gaismas un inkubējiet uz plates krātītāja ar 400-600 apgrēzieniem minūtē 18-28 °C temperatūrā 30 ± 2 minūtes.

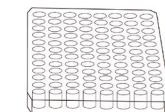


12. Visās iedobēs pievieno 100 µL Stop šķiduma. Nonemiet gaisa burbulus ar pipetes uzgali. Pārejiet uz 13. posmu 30 minūšu laikā.

13. Mikrotitrēšanas plates lasītājā nolasiet absorbciiju pie 450 nm.

100 µL Stop šķiduma

30 minūšu laikā



Absorbciiju nolasā pie 450 nm

KVALITĀTES KONTROLE

Šīs lietošanas instrukcijas rūpīga izpratne ir nepieciešama, lai veiksmīgi lietotu produktu. Uzticamus rezultātus var iegūt tikai tad, ja tiek izmantotas precīzas laboratorijas metodes un precīzi ievērota šī lietošanas instrukcija.

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA komplektam ir trīs kontroles: negatīvā, zemā un vidējā kontrole. Kontrolēm ir piešķirti vērtību diapazoni (% attiecība), kas norādīti katram komplektam pievienotajā kvalitātes kontroles datu lapā. Lai

iegūtu derīgus rezultātus, kontroles mērījumiem ir jāatbilst norādītajiem vērtību diapazoniem. Papildus komplekta kontrolēm iekšējai kvalitātes kontrolei mēs iesakām izmantot seruma kopas.

Kalibrētājam ieteicamā minimālā OD_{450nm} vērtība ir 1,2. Veikspējas raksturlielumiem jābūt noteiktajās robežās. Ja analīzes veikspēja neatbilst noteiktajām robežām un atkārtošana izslēdz tehnikas klūdas, pārbaudiet šādus parametrus: i) temperatūras kontroli (3.-9. posmā izmantotie reāgenti tiek turēti 2-8 °C temperatūrā), ii) termometru, pipetēšanas un laika mērišanas ierīču precizitāti, iii) ELISA lasītāja iestatījumus, iv) reāgentu derīguma termiņus, v) glabāšanas un inkubācijas apstākļus, vi) TMB substrāta šķīduma krāsu (jābūt bezkrāsainam), vii) ūdens tīriņu, viii) aspirācijas un mazgāšanas metodes.

STANDARTIZĀCIJA UN METROLOGISKĀ IZSEKOJAMĪBA

Nav starptautiski vai nacionāli atzītu references materiālu vai references mērišanas procedūru antiganglioziķu vai -MAG antivielu noteikšanai seruma paraugos. BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA ir standartizēts attiecībā pret iekšēji noteiktu references materiālu. Kalibrēšanas vērtības tiek piešķirtas saskaņā ar vērtību pārneses protokolu (2. atsauce), lai garantētu metroloģisko izsekojamību, un ir norādītas patvalīgās "% attiecības" vienībās.

Tika noteikts, ka produktu kalibratoru kombinētās nenoteiktības 95% ticamības intervāls ir 29,3% IgG antivielām un 37,6% IgM antivielām.

TESTA REZULTĀTU APRĒKINS

- Reģistrējet absorbciiju (OD) pie 450 nm katrai iedobei (kalibratoram, kontrolēm un paraugiem).
- Ja ir veikti vairāki kalibrēšanas un kontroles mērījumi, aprēķiniet vidējās vērtības.

Rezultāti ir izteikti kā paraugu absorbcijas un kalibrētāja (vidējās) absorbcijas attiecība.

Izotipu maisījums

paraugu vai kontroles absorbcija

$$\% \text{ attiecība: } \frac{\text{paraugu absorbcija}}{\text{kalibratora absorbcija}} \times 200$$

IgG un IgM izotipi

paraugu vai kontroles absorbcija

$$\% \text{ attiecība: } \frac{\text{paraugu absorbcija}}{\text{kalibratora absorbcija}} \times 100$$

Lielākajai daļai mikroplašu lasītāju ir pieejamas programmas rezultātu aprēķināšanai kā % attiecību.

Piezīme: 7. un 8. tabulā sniegtie rezultāti ir piemēri, un tie sniegti tikai demonstratīviem nolūkiem.

IEROBEŽOJUMI

- Augsts % attiecība (> 100%) atsevišķiem ganglioziķiem var izraisīt savstarpēju reaktivitāti ar citiem ganglioziķiem tajā pašā paraugā. Krusteniskā reaktivitāte parasti uzrāda lielas variācijas starp analīzēm. Tādēļ rezultātu interpretācija jāveic tikai kopā ar ekspertu/speciālistu.
- Nemot vērā autoimūno antivielu polireaktivitāti un ģeogrāfiskās izplatības atšķirības, analīžu rezultāti jāizmanto tikai kā atbalsts neiropātijas klīniskai

interpretācijai, ko veic eksperts/speciālists kopā ar pacienta klīnisko ainu (3. atsauce).

- Šis tests nav apstiprināts plazmaferēzei.
- Intravenozi ievadīti imūnglobulīni (IVIg) var ietekmēt testa rezultātus.

ATSAUCES INTERVĀLI UN ROBEŽVĒRTĪBAS

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA atsauces intervāls tika noteikts saskaņā ar CLSI C28-A3, izmantojot 120 seruma paraugus, kas iegūti no cilvēkiem, kas sevi atzinuši par veseliem. Antiganglioziķu un anti-MAG- antivielas normāliem asins donoriem tika klasificētas titru kategorijās: negatīvs (<30% attiecība), pelēkā zona (30-50% attiecība) un pozitīva (>50% attiecība). Rezultāti ir apkopoti 9. tabulā. Pozitīvā testa robežvērtība ir 50 % attiecība.

REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Antigēns	IgG/IgM maisījums		
	Vērtības (% attiecība)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Negatīvs	Skatīt anotāciju */**	Skatīt anotāciju */**
GM1			
GT1a			
GD1a		Atkārtot testu vēlāk	Pozitīvs
GD1b			
GQ1b			

3. tabula

Antigēns	IgG		
	Vērtības (% attiecība)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Negatīvs	Skatīt anotāciju *	Skatīt anotāciju *
GM1			
GT1a			
GD1a		Atkārtot testu vēlāk	Pozitīvs
GD1b			
GQ1b			

4. tabula

Antigēns	IgM		
	Vērtības (% attiecība)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Negatīvs	Skatīt anotāciju **	Pozitīvs (skatīt anotāciju **)
GM1			
GT1a			
GD1a		Atkārtot testu vēlāk	Pozitīvs
GD1b			
GQ1b			

5. tabula

Testa rezultāti jāinterpretē kopā ar informāciju, kas iegūta, veicot pacienta klīnisko novērtējumu un citas diagnostikas procedūras.

* MAG neiropātija parasti ir saistīta ar IgM izotipa anti-MAG antivielu klātbūtni (4. atsauce).

** HNK-1 rezultātus starp 30 un 50% (pelēkā zona) vai > 50% (pozitīvi), kas iegūti ar maisījumu vai enzīma markieri IgM, var atkārtoti pārbaudīt ar anti-MAG Antibodies ELISA (EK-MAG).

N perifērā neiropātija	201 (102 bērnu GBS, 14 CIDP, 44 GBS, 41 anti-MAG neiropātija)
N kontroles	493 (104 DC, 254 NC, 135 HC)
Jutīgums (95% CI)	68,1% (39,6 – 87,5%)
Specifiskums (95% CI)	88,0% (72,3 – 95,3%)
ROC AUC	0,85

6. tabula

GBS, Guillain-Barré sindroms; DC, ne neuroloģiska slimības kontrole; NC, neuroloģiska kontrole; HC, veselīga kontrole; CIDP, hroniska iekaisuma demielinizējoša polineiropātija; CI, tīcamības intervāls; ROC AUC, laukums zem uztvērēja darbības raksturīknēs.

VEIKTSPĒJAS RAKSTUROJUMS

Metožu salīdzinājums

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA salīdzinājumā ar anti-MAG Antibodies ELISA

Metožu salīdzināšanas pētījums tika veikts saskaņā ar CLSI vadlīnijām EP09-A3 un EP12-A2. Izmantojot 2 partijas BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA un 2 partijas anti-MAG Antibodies ELISA, tika izmērīti simts divdesmit divi (122) paraugi. Tika noteikta diagnostiskā (kappa) atbilstība, negatīvā procentuālā atbilstība un pozitīvā procentuālā atbilstība. Atbilstības ir atspoguļotas 10. tabulā.

Precizitāte laboratorijas ietvaros

Antigangliozi diem: 5,7 - 13,2% CV

Anti-MAG: 14,4 – 36,5% CV

Precizitāte laboratorijas ietvaros tika noteikta saskaņā ar CLSI vadlīnijām EP05-A3, izmantojot standartizētu 20 dienas x 2 mēģinājumi x 2 atkārtojumi pētījuma plānu. Tika testēti trīs (3) apvienoti pacientu seruma paraugi. Rezultāti apkopoti 11. tabulā.

Atkārtojamība

Antigangliozi diem: 7,7 – 19,1% CV

Anti-MAG: 23,5 – 33,2% CV

Reproducējamība tika noteikta saskaņā ar CLSI vadlīnijām EP05-A3, izmantojot pētījuma plānu 3 instrumenti/partijas/operators x 5 dienas x 5 atkārtojumi. Tika testēti trīs (3) apvienoti pacientu seruma paraugi. Rezultāti apkopoti 12. tabulā.

Tukšā saturs robeža (LoB) ≤ noteikšanas robeža (LoD):

≤30% attiecība

LoB un LoD tika noteikti saskaņā ar CLSI vadlīniju EP17-A2, izmantojot neparametrisko analīzi. Rezultāti apkopoti 13. tabulā.

Augstas devas āķa efekts

Mērījumu diapazonā netika novērots ierobežojums, ko radītu augstas devas āķa efekts.

Savstarpējā reaktivitāte

Paraugiem, kas nemitī no pacientiem ar dažādām autoimūnām slimībām (14. tabula) un pacientiem ar citiem neuroloģiskiem traucējumiem (15. tabula), netika novērota sistemātiska savstarpēja reaktivitāte.

KLĪNIKIAS SNIEGUMS

Klīniskā snieguma novērtējums tika veikts, apkopojojot recenzētas zinātniskās literatūras analīzi. Sešos (6) pētījumos tika aplūkota BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA klīniskā veiktspēja autoimūno perifēro neiropātiju diagnostikā (sk. 5-10). Analīzes rezultāti un sīkāka informācija par pētījumiem ir sniegtā attiecīgi 6. tabulā un 16. tabulā.

INTERFERĒJOŠĀS VIELAS

Saskaņā ar CLSI vadlīniju EP07-A3 tika novērtēta testa jutība pret orāli lietojamiem un injicējamiem farmaceitiskiem līdzekļiem, kā arī pret endogēnām vielām. Rezultātu novirze $\geq \pm 20\%$ attiecība tika uzskatīta par interferenci.

Netika konstatēti interferences ar šādām vielām līdz norādītajām koncentrācijām: intravenozi imūnglobulīns (20 mg/mL), rituksimabs (3 mg/mL), kladribīns (273 ng/mL), interferons alfa-2a (49,5 ng/mL), gabapentīns (26,7 µg/mL), ibuprofēns (0,22 mg/mL), hlorambucils (1,96 µg/mL), prednizons (99 ng/mL), prednizolons (1,2 µg/mL), reimatoīdais faktors (2340 IU/mL), hemoglobīns (10 mg/mL), hemolīsāts (10 mg/mL), triglicerīdi (15 mg/mL), konjugētais bilirubīns (20 µg/mL), nekonjugētais bilirubīns (150 µg/mL).

TABULAS UN ATTÉLI

Mikrotitrēšanas plates sagatavošana: IgG/IgM maisījuma markieris

1A attēls: ≤ 24 serumi / komplekts (2 MP / komplekts)

Mikrotitrēšanas plates sagatavošana: IgG un IgM markieri

	IgG						IgM					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Calibrator & Controls	CAL CTRL Low	CTRL Low	CAL CTRL Low									
	CTRL Med	CTRL Neg	CTRL Med	CTRL Neg	CTRL Med	CTRL Neg	CTRL Med	CTRL Neg	CTRL Med	CTRL Neg	CTRL Med	CTRL Neg
HNK-1												
GM1												
GT1a												
GD1a	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
GD1b												
GQ1b												
	6 sera IgG						6 sera IgM					

1B attēls: 2 profili / serums, ≤ 12 serumu / komplekts (2 MP / komplekts)

Rezultātu piemērs

A IgG/IgM maisījuma markieris

B-GCO-ELGM	Absorbēja (OD450)	Attiecība [%]
Kalibrators	2,179	
Kalibrators vidējā vērtība	2,477	100
Vidējā kontrole	2,328	
Vidēja kontrole vidējā vērtība	1,737	
Zemā kontrole	1,891	
Zemā kontrole vidējā vērtība	1,814	78
Negaļīvā kontrole	0,662	
Negaļīvā kontrole vidējā vērtība	0,460	
	0,561	24
1 paraugs HNK-1	0,044	
Negaļīvā kontrole vidējā vērtība	0,046	
	0,045	2
1 paraugs GM1	0,234	10
1 paraugs GT1a	0,543	23
1 paraugs GD1a	1,976	85
1 paraugs GD1b	0,621	27
1 paraugs GQ1b	0,734	32
	2,573	111

7. tabula

B IgG un IgM markieri

Enzīmu markieris	Absorbēja (OD450)		Attiecība [%]	
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM	IgG	IgM	IgG	IgM
Kalibrators	2,488	2,411		
Kalibrators vidējā vērtība	2,446	2,201		
	2,467	2,306	100	100
Vidējā kontrole	1,879	1,734		
Vidēja kontrole vidējā vērtība	1,987	1,818		
	1,933	1,776	78	77
Zemā kontrole	0,452	0,501		
Zemā kontrole vidējā vērtība	0,716	0,609		
	0,584	0,555	24	24
Negatīvā kontrole	0,045	0,048		
Negatīvā kontrole vidējā vērtība	0,037	0,042		
	0,041	0,045	2	2
1 paraugs HNK-1	0,423	0,621	17	27
1 paraugs GM1	2,001	2,102	81	91
1 paraugs GT1a	0,521	0,237	21	10
1 paraugs GD1a	1,984	0,821	80	36
1 paraugs GD1b	0,473	1,923	19	83
1 paraugs GQ1b	0,094	0,911	4	40

8. tabula

TABULAS UN ATTĒLI

Atsauces intervāls

Analizējamā viela	% normālu asins donoru kategorijās			Atsauges robežvērtība (90% CI)
	<30 %	30 - 50 %	>50 %	
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 sieviešu apakšgrupa. M vīriešu apakšgrupa

9. tabula

Anti-MAG antivielu metožu salīdzinājums

Apraksts	N	Kappa atbilstība		NPA		PPA	
		Vērība	95% CI	Vērība	95% CI	Vērība	95% CI
EK-GCM IgM pret 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 pret EK-MAG	122	0,87	0,78 - 0,96	97,0%	89,5% - 99,6%	89,3%	78,1% - 96,0%

10. tabula

NPA: Negatīvā procentuālā atbilstība

PPA: Pozitīvā procentuālā atbilstība

CI: Uzticamības intervāls

Precizitāte laboratorijas ietvaros

Parauga apraksts			Precizitāte laboratorijas ietvaros			
Analizējamā viela	Enzīma markieris (izotips)	Paredzamā kategorija [% attiecība]	N	Vidējais [% attiecība]	SD [% attiecība]	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. tabula

Atkārtojamība

Parauga apraksts			Atkārtojamība		
Analizējamā viela	Enzīma markieris (izotips)	Paredzamā kategorija [% attiecība]	N	Vidējais [% attiecība]	SD [% attiecība]
anti-GM1 Ab	IgM	30-50	75	51	4,9
		>50	75	94	7,2
anti-GQ1b Ab	IgG	30-50	75	39	5,6
		>50	75	106	14,5
anti-MAG Ab	IgM	30-50	75	48	3,9
		>50	75	92	8,2
anti-MAG Ab	IgG	30-50	75	42	8,1
		>50	75	78	15,4
anti-MAG Ab	IgM	30-50	75	43	14,3
		>50	75	98	23,1
anti-MAG Ab	IgGM	30-50	75	42	10,6
		>50	75	97	25,0

12. tabula

LoD un LoB

Analizējamā viela	LoB [% attiecība]	LoD [% attiecība]
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

13. tabula

Savstarpējā reaktivitāte

Norādītā antivieļa	Diagnoze	#
Anti-neitrofilu citoplazmas antivielas (ANCA)	Vaskulīts	3
	Citi (ANCA pozitīvi paraugi)	10
Anti-nukleārās antivielas (ANA)	Sistēmiskā sarkanā vilķede	5
	Reimatoīda artrīts	9
	Sjorgena sindroms	6
	Citi (ANCA pozitīvi paraugi)	3
Anti-tiroglobulīna antivielas (anti-Tg)	Autoimūnais tiroidīts	5
Anti-ribonukleoproteīna antivielas	Jaukta saistaudu slimība	1
Anti-GQ1b, anti-GM1, anti-GD1b	Autoimūnā perifērā neiropātija	1
Anti-acetil-holīns receptoru antivielas un pret muskulījiem specifiska tirozīnkināze	Myasthenia gravis	7

14. tabula

Perifēriskās neiropātijas	#
Alkoholiskais	1
Diabēta	5
Perifēro neiropātiju imitējoši traucējumi	#
Amiotrofiskā laterālā skleroze (ALS)	15
Sarkoidoze	4
Valdenštroma makroglobulinēmija (WM)	4
Čagasa slimība	5

15. tabula

TABULAS UN ATTĒLI

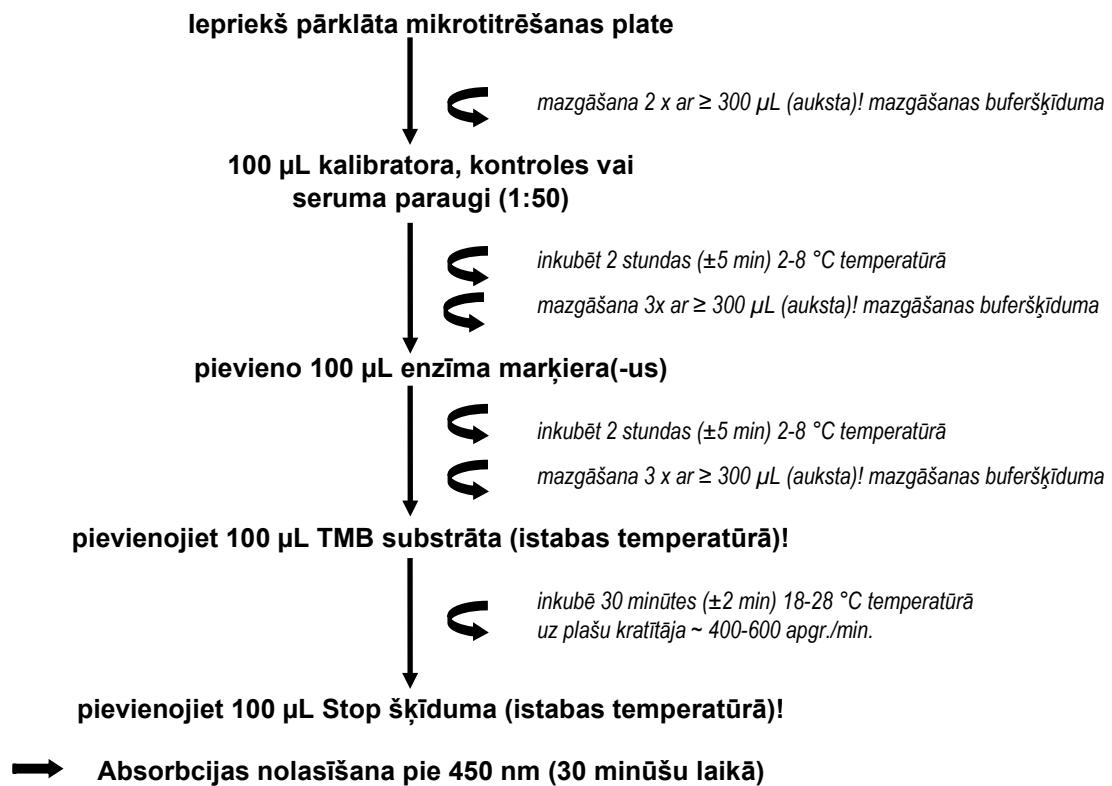
Klīniskais sniegums

Pētījums	Pozitīvās kontroles (gadījumi)	Negatīvās kontroles	Epitops	Sensitivitāte	Specifiskums
Hashemilar u.c., 2014	Pediatrijas GBS (n = 45)	DC (n = 35)	GM1	0,51	0,89
			GQ1b	0,56	0,74
Sharma u.c., 2011	Pediatrijas GBS (n = 57)	NC (n = 42)	GM1	0,82	0,33
		DC (n = 35)			0,83
Khandelwal u.c., 2006	GBS (n = 13)	HC (n = 19)	GM1	0,31	0,74
Uetz-von Allmen u.c., 1998	GBS, CIDP (n = 19, 14)	NC (n = 100)	GM1	0,30	0,93
		HC (n = 110)			0,95
Spatola u.c., 2016	GBS (MFS) (n = 12)	DC (n = 34)	GQ1b	0,92	0,97
Delmont u.c., 2019	MAG-neiropātija (n = 41)	NC (n = 112) HC (n = 6)	HNK-1 (MAG)	0,98	0,99

16. tabula

GBS - Gijēna-Barē sindroms; DC - ne neuroloģiska slimības kontrole; NC - neuroloģiska kontrole; HC - veselīga kontrole; MFS - Millera-Fišera sindroms; CIDP - hroniska iekaisuma demielinizējoša polineiropātija.

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA



LAIKS LĪDZ REZULTĀTIEM: 4,5 STUNDAS

ATSAUCES

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).

IZMAIŅU ŽURNĀLS

Datums	Versija	Izmaiņas
2023-08-17	A1	Lietošanas <i>Paredzētais lietojums</i> un produkta nosaukuma izmaiņas GM2 gangliožīda izņemšana un GT1a gangliožīda ieviešana. <i>Pārbaudes princips</i> pārformulējums ar titru kategorijām: negatīvs, pelēkā zona, pozitīvs Reaģēntu jaunas lietošanas stabilitātes Nodaļas <i>Brīdinājumi un piesardzības pasākumi atjauninājums</i> Pārskatītas nodaļas <i>Paraugu savākšana un uzglabāšana, Testēšanas procedūra un Standartizācija un metroloģiskā izsekojamība</i> . Nodaļas <i>Kvalitātes kontrole</i> pārformulējums Nodaļas <i>Ierobežojumi atjaunināšana</i> Pārskatītas nodaļas <i>Atsauces intervāli un robežvērtības, Veikspējas raksturojums un Interferējošās vielas</i> . Nodaļas <i>Klīniskais sniegums iekļaušana</i> Nodaļu <i>Atsauces un Simboli</i> pārskatīšana Paziņotās struktūras numura pievienošana CE zīmei - atbilstības novērtēšanas procedūra saskaņā ar IVDR 2017/746

ZINOŠANA PAR INCIDENTIEM ES DALĪBVALSTĪS

Ja ir noticis kāds nopietns incidents saistībā ar šo ierīci, lūdzu, nekavējoties ziņojiet ražotājam un savas dalībvalsts kompetentajai iestādei.

PIEGĀDES BOJĀJUMI

Lūdzu, informējiet savu izplatītāju, ja šī prece tika saņemta bojāta.

SIMBOLI

BÜHLMANN izmanto simbolus un zīmes, kas uzskaitīti un aprakstīti ISO 15223-1. Papildus tiek izmantoti šādi simboli un zīmes:

Simbols	Skaidrojums
[MP]	Mikrotitrēšanas plate
[BUF WASH 10X]	Mazgāšanas bufera koncentrāts (10x)
[BUF INC]	Inkubācijas buferis
[CAL]	Kalibrators
[CONTROL -]	Kontrole - negatīvs
[CONTROL L]	Kontrole - zems
[CONTROL M]	Kontrole - vidējs
[EL IgG]	Enzīma markieris IgG
[EL IgM]	Enzīma markieris IgM
[EL MIX]	Enzīma markieris IgG/IgM Mix
[SUBS TMB]	TMB substrāts
[SOLN STOP]	Stop šķīdums

CE 0123