# BÜHLMANN
# GanglioCombi® MAG ELISA

## ze znakowanymi enzymami IgG/IgM Mix, IgG i IgM

## Wykrywanie przeciwciał anty-gangliozydowych i -MAG za pomocą testu ELISA

(HNK-1 (“MAG”), GM1, GT1a, GD1a, GD1b i GQ1b)

Do diagnostyki *in vitro*

EK-GCM 2 x 96 testów

Data wydania: 2023-08-17
Wersja A1

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

# POLSKI

## PRZEZNACZENIE

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA jest testem diagnostycznym *in vitro* do półilościowego oznaczania przeciwciał IgG i/lub IgM przeciwko wybranym antygenom/ epitopom neuronalnym w próbkach surowicy. Wyniki testu mogą służyć jako pomoc w diagnozowaniu autoimmunologicznych neuropatii obwodowych w połączeniu z innymi wynikami klinicznymi i laboratoryjnymi. Tylko do użytku laboratoryjnego.

## ZAMIERZONE ZASTOSOWANIE

Trzy enzymatyczne znaczniki, dostarczone w zestawie umożliwiają trzy różne algorytmy testowania:

1. Badanie z użyciem mieszaniny koniugatów IgG/IgM (dalej zwana mieszaniną) pozwala na przesiewowe stwierdzenie obecności przeciwciał antyneuronalnych sugerujących neuropatię o podłożu autoimmunologicznym.
2. Badanie pojedynczych koniugatów IgG i/lub IgM pozwala na określenie izotypu przeciwciała.
3. W przypadku prac laboratoryjnych wstępne badanie przesiewowe próbek przy użyciu mieszaniny (opcja 1), po którym próbki z wynikiem pozytywnym można różnicować przy użyciu poszczególnych koniugatów IgG i IgM (opcja 2).

## ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Test BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA umożliwia pomiar przeciwciał przeciwko gangliozydom i glikoproteinie związanej z mieliną (MAG) w surowicy. Płytka do mikromiareczkowania jest pokryta gangliozydami: GM1, GT1a, GD1a, GD1b, GQ1b i syntetyzowanym chemicznie epitopem HNK-1 glikoproteiny MAG (ref. 1).
Surowice pacjentów, kontrole i kalibrator są dodawane do dołków płytki do mikromiareczkowania. Po 2 godzinach inkubacji w temperaturze 2 – 8°C i etapach przemywania, przeciwciała detekcyjne (anty-IgG/IgM, anty-IgG, anty-IgM) skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP) wykrywają przeciwciała anty-gangliozydowe i/lub anty-MAG związane z unieruchomionymi gangliozydami lub HNK-1 na płytce. Po kolejnych 2 godzinach inkubacji i dalszych etapach przemywania, dodaje się chromogeniczny substrat HRP, tetrametylobenzydynę (TMB), (tworzenie się niebieskiego zabarwienia) po czym następuje zatrzymanie reakcji (zmiana koloru na żółty). Absorpcję mierzy się przy 450 nm. Zmierzona absorbancja jest proporcjonalna do miana przeciwciał obecnych w danej próbce. Miana przeciwciał są wyrażone jako % stosunki kalibratora i mogą być przypisane do kategorii miana (negatywne, szara strefa, pozytywne).

## DOSTARCZONE ODCZYNNIKI I ICH PRZYGOTOWANIE

| Odczynniki | Ilość | Kod | Rekonstytucja |
|---|---|---|---|
| **Płytka do mikromiareczkowania**<br>wstępnie opłaszczona gangliozydami i HNK-1 | 2 x12 x 8 dołkowe paski z ramką | B-GCM-MP | Gotowy do użycia |
| **Folia do płytek** | 6 sztuki | | |
| **Koncentrat buforu płuczącego (10x)**<br>z środkami konserwującymi | 2 butelki<br>x 100 mL | B-GCO-WB | Rozcieńczyć z 900 mL wody dejonizowanej |
| **Bufor inkubacyjny**<br>z środkami konserwującymi | 1 butelka<br>x 100 mL | B-GCO-IB | Gotowy do użycia |
| **Kalibrator**<br>zliofilizowane ze środkami konserwującymi | 1 fiolka | B-GCO-CA | Dodać 1,5 mL buforu inkubacyjnego |
| **Kontrola Negatywna, Niska i Średnia** [1]<br>zliofilizowane ze środkami konserwującymi | 3 fiolki | B-GCO-CONSET | Dodać 1,5 mL buforu inkubacyjnego |
| **Mieszanina IgG/IgM znakowana enzymem**<br>anty-ludzkie przeciwciała IgG i IgM skoniugowane z HRP w matrycy buforowej ze środkami konserwującymi | 2 fiolki<br>x 11 mL | B-GCO-ELGM | Gotowy do użycia |
| **Znakowane enzymem IgG**<br>anty-ludzkie przeciwciało IgG skoniugowane z HRP w matrycy buforowej ze środkami konserwującymi | 1 fiolka<br>x 11 mL | B-GCO-ELG | Gotowy do użycia |
| **Znakowane enzymem IgM**<br>anty-ludzkie przeciwciało IgM skoniugowane z HRP w matrycy buforowej ze środkami konserwującymi | 1 fiolka<br>x 11 mL | B-GCO-ELM | Gotowy do użycia |
| **Substrat TMB**<br>TMB w buforze cytrynianowym | 2 fiolki<br>x 11 mL | B-TMB | Gotowy do użycia |
| **Roztwór zatrzymujący reakcję**<br>0.25 M kwas siarkowy | 2 fiolki<br>x 11 mL | B-STS | Gotowy do użycia<br>**Środek żrący** |

Tabela 1

[1] Kontrole zawierają specyficzne dla partii poziomy przeciwciał anty-GM1. Rzeczywistą średnią OD i stosunek % można znaleźć w dodatkowym arkuszu danych QC.

## PRZECHOWYWANIE I TRWAŁOŚĆ ODCZYNNIKÓW

| **Zamknięte odczynniki / nieotwarte odczynniki** | |
|---|---|
| Przechowywać w temperaturze 2-8 °C. Nie używać odczynników po upływie daty ważności wydrukowanej na etykiecie. | |
| **Otwarte / rekonstytuowane odczynniki** | |
| Płytka do mikromiareczkowania | Niezużyte stripy natychmiast włożyć z powrotem do torebki foliowej zawierającej saszetki ze środkiem osuszającym i ponownie szczelnie zamknąć wzdłuż całej krawędzi torebki.<br>Przechowywać do 6 miesięcy w temperaturze 2-8 °C. |
| Rozcieńczony bufor płuczący | Przechowywać do 6 miesięcy w temperaturze 2-8 °C. |
| Bufor inkubacyjny | |
| Enzymatyczne znaczniki | |
| Substrat TMB | |
| Kalibrator | |
| Kontrole | |
| Roztwór zatrzymujący reakcję | Przechowywać do 6 miesięcy w temperaturze 18-28 °C. |

Tabela 2

## NIEZBĘDNE MATERIAŁY, KTÓRE NIE ZOSTAŁY DOSTARCZONE

- Automatyczne pipety z jednorazowymi końcówkami: 10 µL, 20 µL, 100 µL i 1000 µL
- Jednorazowe probówki polistyrenowe lub polipropylenowe do przygotowywania rozcieńczeń próbek
- 1000 mL cylinder do rozcieńczania buforu płuczącego
- Płuczka do płytek do mikromiareczkowania
- Bibuła matująca
- Wytrząsarka do płytek do mikromiareczkowania
- Czytnik płytek do mikromiareczkowania do pomiaru absorbancji przy 450 nm.

## OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

### Środki ostrożności

- Kalibrator i kontrole tego zestawu zawierają składniki pochodzenia ludzkiego. Chociaż testy na obecność HBV, HCV i HIV1/2 dały wynik ujemny, to z odczynnikami należy obchodzić się tak, jakby były zdolne do przenoszenia infekcji, czyli zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP), stosując odpowiednie środki ostrożności.
- Zestaw zawiera składniki sklasyfikowane zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008:
  - Roztwór zatrzymujący reakcję zawiera kwas siarkowy (stęż. 2,5 – 5%), w związku z tym, odczynniki mogą wywoływać podrażnienie skóry (H315), silne podrażnienie oczu (H319), i mogą powodować korozję metali (H290).
  - Kalibrator, kontrole i enzymatyczne znaczniki zawierają chlorowodorek 2-metylo-4-izotiazolin-3-onu (stęż. ≥ 0,0015%), w związku z tym, odczynniki mogą powodować reakcje alergiczne skóry (H317).
  - Bufor inkubacyjny i bufor płuczący zawierają siarczan gentamycyny, w związku z tym, odczynniki mogą powodować reakcje alergiczne skóry (H317).
- Unikać kontaktu odczynników ze skórą, oczami lub błonami śluzowymi. W przypadku kontaktu, natychmiast przemyć narażone miejsce dużą ilością wody; w przeciwnym razie może dojść do podrażnienia/oparzeń.
- Odczynniki i chemikalia należy traktować jako odpady niebezpieczne zgodnie z krajowymi wytycznymi lub przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa biologicznego.

### Techniczne środki ostrożności

- Należy zapoznać się z instrukcją przed wykonaniem testu. Niewłaściwe rozcieńczanie, modyfikowanie lub przechowywanie odczynników w warunkach innych niż opisane w niniejszej instrukcji będzie miało negatywny wpływ na wydajność testu.

### Procedura testu ELISA

#### Temperatura odczynników

- Należy przygotować odczynniki przed rozpoczęciem procedury oznaczania. Etapy 3-9: Odczynniki użyte w etapach 3-9 muszą być zimne (2-8 °C) i utrzymywane w niskiej temperaturze podczas pipetowania i płukania. Zalecenie: Przygotować bufor płuczący dzień przed wykonaniem testu i zostawić na noc w lodówce.
- Wszystkie etapy płukania wykonać za pomocą zimnego (2-8 °C) buforu płuczącego.
- Substrat TMB i roztwór zatrzymujący reakcję doprowadzić do temperatury pokojowej (18-28 °C) na początku procedury oznaczania.

#### Etapy płukania

- Etapy płukania 3, 6 i 9 są kluczowe dla usunięcia pozostałości powstałych w wyniku procesu produkcyjnego i/lub potencjalnie niezwiązanych przeciwciał w studzienkach.
- Zdecydowanie zaleca się automatyczną myjkę działającą w trybie “plate mode”, tj. każdy etap procesu (dozowanie/zasysanie) jest wykonywany na wszystkich paskach, sekwencyjnie, zanim urządzenie przejdzie do następnego cyklu płukania.
- Należy upewnić się, że wszystkie studzienki są całkowicie opróżnione po ostatnim cyklu płukania.

#### Inkubacja substratu

- Etap 11: Podczas inkubacji z substratem należy wstrząsnąć płytkami do mikromiareczkowania. W zależności od modelu wytrząsarki do płytek, zaleca się wytrząsanie przy 400-600 rpm. Roztwór powinien poruszać się w studzienkach, ale nie może się rozlewać.

### Elementy zestawu

- Składników nie wolno używać po upływie daty ważności wydrukowanej na opakowaniu.
- Nie mieszać odczynników o różnych numerach partii.
- Należy dołożyć wszelkich starań, aby nie doszło do zanieczyszczenia krzyżowego między odczynnikami, próbkami lub między studzienkami.
- Mikrostudzienki nie mogą być użyte ponownie.

## POBIERANIE PRÓBEK I ICH PRZECHOWYWANIE

Procedura wymaga odpowiednio <0,1 mL krwi lub <50 µL surowicy.

W celu uniknięcia hemolizy, pobrać krew do zwykłych probówek bez żadnych dodatków. Przygotować surowicę zgodnie z zaleceniami producenta. Zdekantować surowicę. Próbki surowicy mogą być przechowywane w temperaturze 2-8 °C do ośmiu tygodni, w temperaturze 28 °C do jednego tygodnia i w temperaturze ≤-20 °C przez 16 tygodni.Zamrożone próbki należy przed użyciem rozmrozić i dokładnie wymieszać poprzez delikatne obracanie lub odwracanie.

Zaleca się rozporcjowanie próbek surowicy przed zamrożeniem w celu uniknięcia powtarzających się cykli zamrażania/rozmrażania.

## PROCEDURA WYKONANIA TESTU

**Istnieją dwie opcje:**

(1) Detekcja mieszanych izotypów (IgG i IgM): dodać mieszaninę enzymatycznych znaczników w punkcie 7

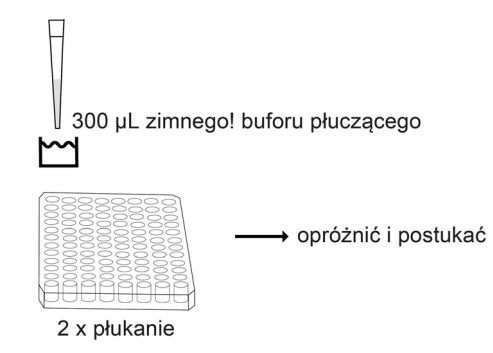
(2) Detekcja izotypów IgG lub IgM: dodać znakowany enzymem IgG lub znakowany enzymem IgM w punkcie 7

*Uwaga: Zrównoważyć roztwór substratu TMB do temperatury pokojowej (18-28 °C).*

1. Rozcieńczyć próbki w stosunku 1:50 z buforem inkubacyjnym. Należy użyć np. 20 µL surowicy + 980 µL zimnego! (2-8 °C) buforu inkubacyjnego. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie i pozostawić rozcieńczone próbki, jak również rekonstytuowany kalibrator i kontrole w temperaturze 2-8 °C na 30 minut przed pipetowaniem (należy odnieść się do punktu 4a i b).
2. Przygotować ramkę płytki z wystarczającą ilością pasków do przetestowania wymaganej liczby kalibratorów, kontroli i próbek. Usunąć nadmiar pasków z ramki i bezzwłocznie zamknąć je ponownie w torebce foliowej wraz ze środkiem pochłaniającym wilgoć. Przechowywać w warunkach chłodniczych

*Uwaga: W etapach 3 do 9 użyć zimnych odczynników.*

3. Przepłukać studzienki dwukrotnie, używając co najmniej 300 µL zimnego! (2-8 °C) buforu płuczącego na studzienkę.Opróżnić studzienki i postukać mocno płytką w bibułę, aby usunąć całkowicie pozostały płyn.




*Uwaga: Natychmiast przejść do kolejnych etapów.*

4a. Dodać 100 µL kalibratora do studzienki A1 (odnieść się do ryciny 1A dla opcji 1 lub ryciny 1B dla opcji 2).

4b. .Dodać 100 µL kontroli średniej do studzienki B1, kontroli niskiej do studzienki A2 i kontroli negatywnej do studzienki B2 (odnieść się do ryciny 1A lub 1B).

*Uwaga dla opcji 1: Jeżeli używanych jest więcej niż trzy paski na serię, kalibrator i kontrole mogą być testowane w duplikatach (odnieść się do ryciny 1A).*

*Uwaga dla opcji 2: Kalibrator i kontrole powinny być testowane oddzielnie dla izotypów IgG i IgM (patrz rycina 1B).*

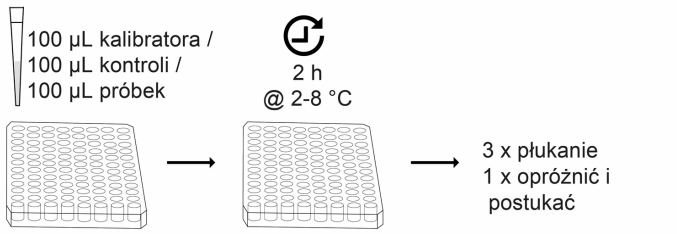
4c. Dodać 100 µL rozcieńczonej próbki 1 do studzienek C1-H1 (odnieść się do ryciny 1A lub 1B).

4d. Dodać 100 µL rozcieńczonej próbki 2 do studzienek C2-H2 (odnieść się do ryciny 1A lub 1B).

4e. Dodać 100 µL rozcieńczonych próbek 3-24 (dla opcji 1) lub 3-12 (dla opcji 2) do kolejnych studzienek (odnieść się do ryciny 1A lub 1B).

*Uwaga dla opcji 2: Powtórzyć pipetowanie próbek 1-12 w tej samej kolejności do pozostałych studzienek w celu testowania drugiego izotypu.*

5. Przykryć płytkę folią do płytek i inkubować przez 2 godziny (±5 min) w temperaturze 2-8 °C (nie wstrząsać płytki).
6. Zdjąć folię z płytki. Opróżnić studzienki i przepłukać trzy razy przy użyciu co najmniej 300 µL zimnego! (2-8 °C) buforu płuczącego na studzienkę. Opróżnić studzienki i mocno stuknąć płytką o bibułę w celu całkowitego pozbycia się buforu płuczącego.



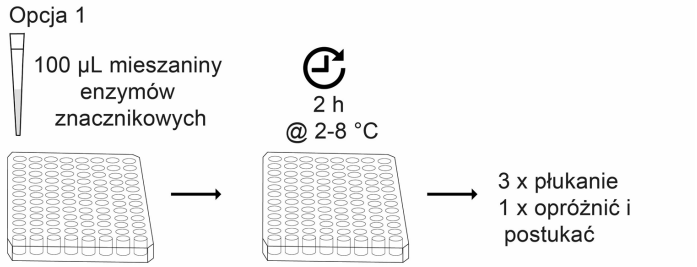

**Dla opcji 1: Detekcja mieszaniny izotypów**

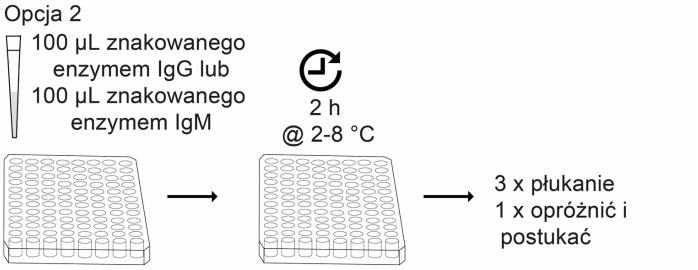
7. Dodać 100 µL mieszaniny do studzienek.

**Dla opcji 2: Detekcja izotypów IgG lub IgM**

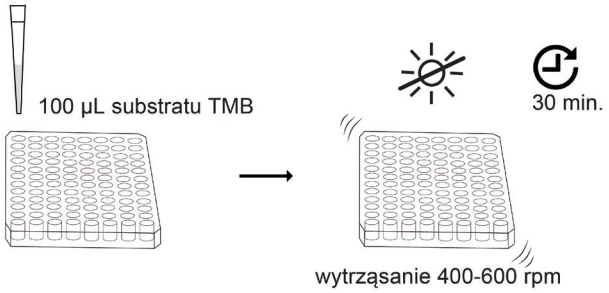
7'. Dodać 100 µL znakowanego enzymem IgG lub IgM do odpowiednich studzienek (odnieść się do ryciny 1B).

8. Przykryć płytkę folią do płytek i inkubować przez 2 godziny (±5 min) w temperaturze 2-8 °C (nie wstrząsać płytki).
9. Zdjąć folię z płytki. Opróżnić studzienki i przepłukać trzy razy przy użyciu co najmniej 300 µL zimnego! (2-8 °C) buforu płuczącego na studzienkę. Opróżnić studzienki i postukać mocno płytką w bibułę.



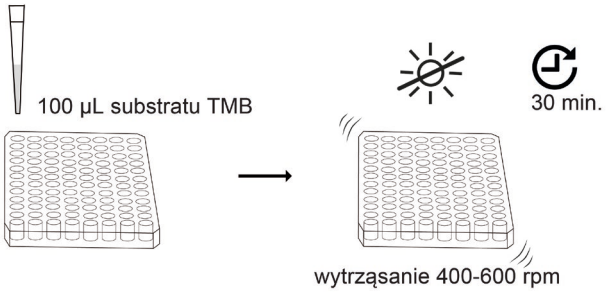




10. Dodać 100 µL roztworu substratu TMB (zrównoważonego do temperatury pokojowej) do każdej studzienki.
11. Przykryć płytkę folią do płytek, chronić płytkę przed światłem i inkubować na wytrząsarce do płytek przy 400-600 rpm, w temperaturze 18-28 °C przez 30 ±2 minuty.




12. Dodać 100 µL roztworu zatrzymującego reakcję do wszystkich studzienek. Usunąć bąble powietrza przy pomocy końcówki od pipety. Przejść do etapu 13 w ciągu 30 minut.

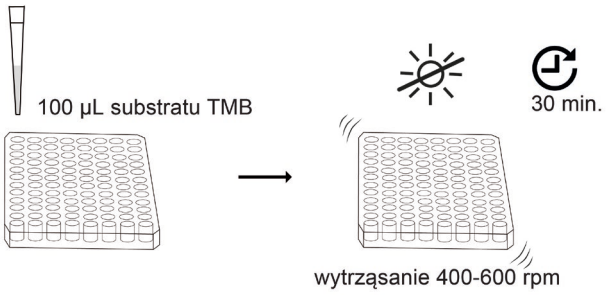
13. Dodać 100 µL roztworu substratu TMB (zrównoważonego do temperatury pokojowej) do każdej studzienki.
14. Przykryć płytkę folią do płytek, chronić płytkę przed światłem i inkubować na wytrząsarce do płytek przy 400-600 rpm, w temperaturze 18-28 °C przez 30 ±2 minuty.



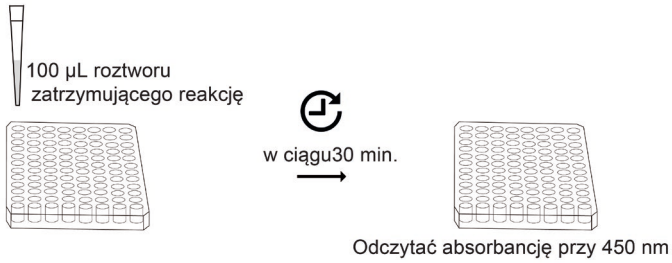

15. Dodać 100 µL roztworu zatrzymującego reakcję do wszystkich studzienek. Usunąć bąble powietrza przy pomocy końcówki od pipety. Przejść do etapu 13 w ciągu 30 minut.

Dodać 100 µL roztworu substratu TMB (zrównoważonego do temperatury pokojowej) do każdej studzienki.

16. Przykryć płytkę folią do płytek, chronić płytkę przed światłem i inkubować na wytrząsarce do płytek przy 400-600 rpm, w temperaturze 18-28 °C przez 30 ±2 minuty.




17. Dodać 100 µL roztworu zatrzymującego reakcję do wszystkich studzienek. Usunąć bąble powietrza przy pomocy końcówki od pipety. Przejść do etapu 13 w ciągu 30 minut.
18. Odczytać absorbancję przy 450 nm przy użyciu czytnika do płytek.




## KONTROLA JAKOŚCI

Dokładne zrozumienie niniejszej instrukcji jest konieczne do prawidłowego użytkowania produktu. Wiarygodne wyniki można uzyskać tylko przy użyciu precyzyjnych technik laboratoryjnych i dokładnego przestrzegania niniejszej instrukcji.
Zestaw BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA zawiera trzy kontrole: negatywną, niską i średnią. Kontrolom przypisano zakresy wartości (stosunek %) wskazane w arkuszu danych QC dostarczonym z każdym zestawem. Pomiary kontrolne muszą mieścić się we wskazanych zakresach wartości, aby uzyskać prawidłowe wyniki. Oprócz kontroli z zestawu, zaleca się stosowanie pul surowicy do wewnętrznej kontroli jakości.
Dla kalibratora zalecana jest minimalna wartość $OD_{450nm}$ wynosząca 1,2.
Charakterystyka wydajności powinna mieścić się w ustalonych granicach. Jeżeli wydajność testu nie spełnia ustalonych limitów, a powtarzalność wykluczyła błędy techniczne, należy sprawdzić następujące kwestie: i) kontrolowanie temperatury (odczynniki stosowane w etapach 3-9 przechowywać w temperaturze 2-8 °C) ii) dokładność termometrów, pipet i czasomierzy; iii) ustawienia czytnika ELISA; iv) daty ważności odczynników v) warunki przechowywania i inkubacji; vi) kolor roztworu substratu TMB (powinien być bezbarwny); vii) czystość wody; viii) metody aspiracji i płukania.

## STANDARYZACJA I ZGODNOŚĆ METROLOGICZNA

Nie ma uznanych w skali międzynarodowej i krajowej referencyjnych materiałów ani referencyjnych procedur pomiarowych dla przeciwciał anty-gangliozydowych i -MAG w próbkach surowicy. Zestaw BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA jest standaryzowany względem wewnętrznie ustalonego materiału referencyjnego. Wartości kalibratorów są przypisywane zgodnie z protokołem transferu wartości (ref. 2), w celu zagwarantowania spójności metrologicznej i są podawane w dowolnych jednostkach “stosunku %”.
95% przedział ufności łącznej niepewności kalibratorów produktu został określony jako 29,3% dla przeciwciał IgG i 37,6% dla przeciwciał IgM.

## OBLICZANIE WYNIKÓW TESTU

1. Odczytać absorbancję (OD) przy 450 nm dla każdej studzienki (kalibrator, kontrole i próbki).
2. Jeżeli wykonano wiele pomiarów kalibratora i kontroli, należy uśrednić wyniki.

Wyniki wyrażone są jako stosunek absorbancji próbek do (uśrednionej) absorbancji kalibratora.

**Mieszanina izotypów**

$$\text{Stosunek \%} = \frac{\text{absorbancja próbek lub kontroli}}{\text{absorbancja kalibratora}} \times 200$$

**Izotypy IgG i IgM**

$$\text{Stosunek \%} = \frac{\text{absorbancja próbek lub kontroli}}{\text{absorbancja kalibratora}} \times 100$$

Programy do obliczania wyników jako stosunek % są dostępne dla większości czytników mikropłytek.

*Uwaga: Wyniki zaprezentowane w tabelach 7 i 8 są przykładami i są dostarczone tylko dla celów pokazowych.*

## OGRANICZENIA

- Wyniki o wysokim stosunku % (> 100%) dla poszczególnych gangliozydów mogą powodować reaktywność krzyżową z innymi gangliozydami w tej samej próbce. Reaktywność krzyżowa będzie zazwyczaj wykazywała dużą zmienność między oznaczeniami.

Interpretacja wyników powinna być zatem dokonywana wyłącznie z ekspertem/specjalistą.

- Ze względu na polireaktywność przeciwciał autoimmunologicznych i różnice w częstości występowania w poszczególnych regionach geograficznych, wyniki testów powinny być wykorzystywane wyłącznie do wspierania klinicznej interpretacji neuropatii przez eksperta/specjalistę w połączeniu z obrazem klinicznym pacjenta. (ref. 3).
- Niniejszy test nie został zwalidowany dla plazmaferezy.
- Dożylne immunoglobuliny (IVIg) mogą wpływać na wyniki testów.

## PRZEDZIAŁY REFERENCYJNE I WARTOŚCI CUT-OFF

Przedział referencyjny dla testu BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA został ustalony zgodnie z CLSI C28-A3 dla 120 próbek surowicy od osób deklarujących się jako zdrowe. Częstość występowania przeciwciał anty-gangliozydowych i anty-MAG u zdrowych dawców krwi została sklasyfikowana według kategorii miana: negatywne (<30% stosunek), szara strefa (stosunek 30-50%) i pozytywne (>50% stosunek). Wyniki podsumowano w tabeli 9. Wartość cut-off dla wyniku pozytywnego wynosi stosunek 50%.

## INTERPRETACJA WYNIKÓW

| Antygen | Mieszanina IgG/IgM | | |
|---|---|---|---|
| | Wartości (stosunek %) | | |
| | <30 | 30-50 | >50 |
| HNK-1 | Negatywny | Odnieść się do adnotacji */** | Odnieść się do adnotacji */** |
| GM1 | | Przetestować ponownie w późniejszym czasie | Pozytywny |
| GT1a | | | |
| GD1a | | | |
| GD1b | | | |
| GQ1b | | | |

Tabela 3

| Antygen | IgG | | |
|---|---|---|---|
| | Wartości (stosunek %) | | |
| | <30 | 30-50 | >50 |
| HNK-1 | Negatywny | Odnieść się do adnotacji * | Odnieść się do adnotacji * |
| GM1 | | Przetestować ponownie w późniejszym czasie | Pozytywny |
| GT1a | | | |
| GD1a | | | |
| GD1b | | | |
| GQ1b | | | |

Tabela 4

| Antygen | IgM | | |
|---|---|---|---|
| | Wartości (stosunek %) | | |
| | <30 | 30-50 | >50 |
| HNK-1 | Negatywny | Odnieść się do adnotacji ** | Pozytywny (odnieść się do adnotacji **) |
| GM1 | | Przetestować ponownie w późniejszym czasie | Pozytywny |
| GT1a | | | |
| GD1a | | | |
| GD1b | | | |
| GQ1b | | | |

Tabela 5

Wyniki badań należy interpretować w połączeniu z informacjami dostępnymi z oceny klinicznej pacjenta i innych procedur diagnostycznych.

* Neuropatia MAG jest często związana z obecnością przeciwciał anty-MAG o izotypie IgM (ref. 4).

** Wyniki pomiędzy 30 a 50% (szara strefa) lub > 50% (pozytywne) dla HNK-1 uzyskane z mieszaniną lub znakowanym enzymem IgM mogą być ponownie przetestowane przy użyciu testu anti-MAG Antibodies ELISA (EK-MAG).

## CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCI

### Porównanie metod

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

Porównanie metod wykonano zgodnie z wytycznymi CLSI EP09-A3 i EP12-A2. Analizie poddano sto dwadzieścia dwie (122) próbki przy wykorzystaniu dwóch różnych partii zestawu BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA i 2 różnych partii zestawu anti-MAG Antibodies ELISA. Określono zgodność diagnostyczną (kappa), procentową zgodność negatywną i procentową zgodność pozytywną. Wyniki przedstawiono w tabeli 10.

**Precyzja wewnątrzlaboratoryjna**
**Dla anty-gangliozydów: 5,7 – 13,2% CV**
**Dla anty-MAG: 14,4 – 36,5% CV**

Precyzję wewnątrzlaboratoryjną ustalono zgodnie z wytycznymi CLSI EP05-A3, wykorzystując standardowy schemat badania 20 dni x 2 serie x 2 powtórzenia. Analizowano trzy (3) połączone próbki surowicy. Wyniki podsumowano w tabeli 11.

**Odtwarzalność**
**Dla anty-gangliozydów: 7,7 – 19,1% CV**
**Dla anty-MAG: 23,5 – 33,2% CV**

Odtwarzalność ustalono zgodnie z wytycznymi CLSI EP05-A3, wykorzystując schemat badania 3 urządzenia/numery partii/operatorzy x 5 dni x 5 powtórzeń. Testowano trzy (3) połączone próbki surowicy. Wyniki podsumowano w tabeli 12.

**Granica próby ślepej (LoB) ≤ Granica wykrywalności (LoD): ≤30% stosunek**

Wartości LoB i LoD ustalono zgodnie z wytycznymi CLSI EP17-A2 przy użyciu analizy nieparametrycznej. Wyniki podsumowano w tabeli 13.

**“Efekt haka” w wysokiej dawce**

Nie zaobserwowano ograniczeń zakresu pomiarowego wynikających z efektu haka wysokiej dawki.

**Reaktywność krzyżowa**

Nie zaobserwowano systematycznej reaktywności krzyżowej dla próbek od pacjentów z różnymi chorobami autoimmunologicznymi (tabela 14) i od pacjentów z innymi zaburzeniami neurologicznymi (tabela 15).

## WYDAJNOŚĆ KLINICZNA

Wydajność kliniczna została oceniona na podstawie podsumowującej analizy recenzowanej literatury naukowej. Sześć (6) badań dotyczyło wydajności klinicznej testu the BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA w diagnostyce autoimmunologicznych neuropatii obwodowych (ref. 5-10). Wyniki analizy i szczegóły badania przedstawiono odpowiednio w tabeli 6 i tabeli 16.

| | |
|---|---|
| N neuropatia obwodowa | 201 (102 pediatryczne GBS, 14 CIDP, 44 GBS, 41 anty-MAG neuropatia) |
| N kontrole | 493 (104 DC, 254 NC, 135 HC) |
| Czułość (95% CI) | 68,1% (39,6 – 87,5%) |
| Specyficzność (95% CI) | 88,0% (72,3 – 95,3%) |
| ROC AUC | 0,85 |

Tabela 6

GBS, Guillain-Barré-Syndrom; DC, Kontrola chorób nieneurologicznych; NC, Kontrola Neurologiczna; HC, Zdrowa Kontrola; CIDP, Przewlekła zapalna polineuropatia demielinizacyjna; CI, przedział ufności; ROC AUC, obszar pod krzywą charakterystyki operacyjnej odbiornika

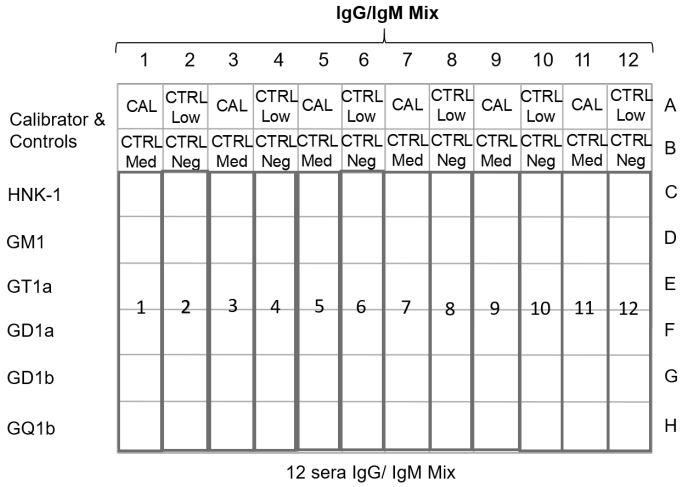
## SUBSTANCJE INTERFERUJĄCE

Wrażliwość testu na farmaceutyki podawane doustnie i we wstrzyknięciach oraz na substancje endogenne oceniono zgodnie z wytycznymi CLSI EP07-A3. Błąd systematyczny wyników ≥ ± 20% stosunku uznano za interferencję.

Nie wykryto interferencji z następującymi substancjami do podanych stężeń: immunoglobulina dożylna (20 mg/mL), rytuksymab (3 mg/mL), kladrybina (273 ng/mL), Interferon alfa-2a (49,5 ng/mL), gabapentyna (26,7 µg/mL), ibuprofen (0,22 mg/mL), chlorambucyl (1,96 µg/mL), prednizon (99 ng/mL), prednizolon (1,2 µg/mL), czynnik reumatoidalny (2340 IU/mL), hemoglobina (10 mg/mL), hemolizat (10 mg/mL), triglicerydy (15 mg/mL), związana bilirubina (20 µg/mL), niezwiązana bilirubina (150 µg/mL).

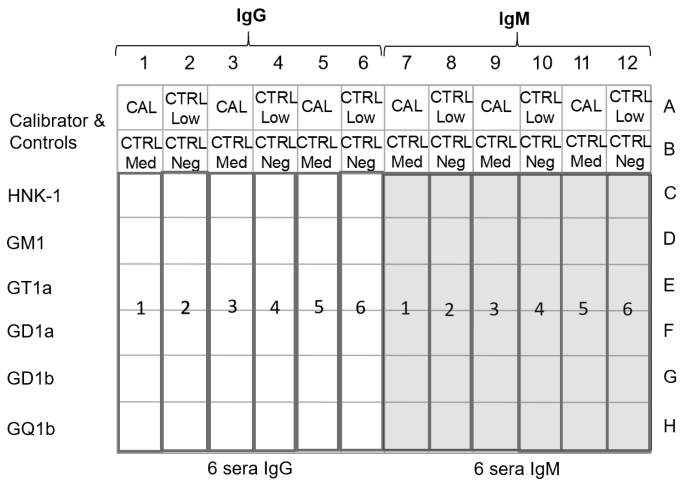
## TABELE I RYCINY

### Konfiguracja płytki do mikromiareczkowania: znakowana mieszanina IgG/IgM




Rycina 1A: ≤ 24 surowica / Zestaw (2 MP / Zestaw)

### Konfiguracja płytki do mikromiareczkowania: znakowane IgG & IgM




Rycina 1B : 2 profil e / surowica, ≤ 12 surowic / Zestaw (2 MP / Zestaw)

### A Znakowana mieszaninina IgG/IgM

| B-GCO-ELGM | Absorbancja (OD450) | Stosunek [%] |
|---|---|---|
| Kalibrator<br><br>Średnia wartość kalibratora | 2,179<br>2,477<br>2,328 | 100 |
| Średnia kontrola<br><br>Średnia wartość średniej kontroli | 1,737<br>1,891<br>1,814 | 78 |
| Niska kontrola<br><br>Średnia wartość niskiej kontroli | 0,662<br>0,460<br>0,561 | 24 |
| Negatywna kontrola<br><br>Średnia wartość negatywnej kontroli | 0,044<br>0,046<br>0,045 | 2 |
| Próbka 1<br>HNK-1 | 0,234 | 10 |
| Próbka 1<br>GM1 | 0,543 | 23 |
| Próbka 1<br>GT1a | 1,976 | 85 |
| Próbka 1<br>GD1a | 0,621 | 27 |
| Próbka 1<br>GD1b | 0,734 | 32 |
| Próbka 1<br>GQ1b | 2,573 | 111 |

Tabela 7

### B Znakowane IgG & IgM

| Enzymatyczny znacznik | Absorbancja (OD450) | | Stosunek [%] | |
|---|---|---|---|---|
| B-GCO-ELG/<br>B-GCO-ELM | IgG | IgM | IgG | IgM |
| Kalibrator<br><br>Średnia wartość kalibratora | 2,488<br>2,446<br>2,467 | 2,411<br>2,201<br>2,306 | 100 | 100 |
| Średnia kontrola<br><br>Średnia wartość średniej kontroli | 1,879<br>1,987<br>1,933 | 1,734<br>1,818<br>1,776 | 78 | 77 |
| Kontrola niska<br><br>Średnia wartość niskiej kontroli | 0,452<br>0,716<br>0,584 | 0,501<br>0,609<br>0,555 | 24 | 24 |
| Kontrola negatywna<br><br>Średnia wartość negatywnej kontroli | 0,045<br>0,037<br>0,041 | 0,048<br>0,042<br>0,045 | 2 | 2 |
| Próbka 1<br>HNK-1 | 0,423 | 0,621 | 17 | 27 |
| Próbka 1<br>GM1 | 2,001 | 2,102 | 81 | 91 |
| Próbka 1<br>GT1a | 0,521 | 0,237 | 21 | 10 |
| Próbka 1<br>GD1a | 1,984 | 0,821 | 80 | 36 |
| Próbka 1<br>GD1b | 0,473 | 1,923 | 19 | 83 |
| Próbka 1<br>GQ1b | 0,094 | 0,911 | 4 | 40 |

Tabela 8

## TABELE I RYCINY

### Przedziały referencyjne

| Analit | % zwykłych krwiodawców w kategoriach | | | Limit referencyjny |
|---|---|---|---|---|
| | <30 % stosunek | 30 - 50 % stosunek | >50 % stosunek | (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* podgrupa kobiet. *M* podgrupa mężczyzn

Tabela 9

### Porównanie z metodą przeciwciała anty-MAG

| Opis | N | Zgodność Kappa | | NPA | | PPA | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Wartość | 95% CI | Wartość | Wartość | 95% CI | Wartość |
| 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% |

Tabela 10

NPA: Procentowa Zgodność Negatywna
PPA: Procentowa Zgodność Pozytywna
CI: Przedział ufności

### Precyzja wewnątrzlaboratoryjna

| Opis próbki | | | Precyzja wewnątrzlaboratoryjna y | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Analit | Enzymatyczny znacznik (Izotyp) | Oczekiwana kategoria [% stosunek] | N | Średnia [% stosunek] | SD [% stosunek] | CV [%] |
| anty-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 |
| anty-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 |
| anty-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 |

Tabela 11

### Odtwarzalność

| Opis próbki | | | Odtwarzalność | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Analit | Enzymatyczny znacznik (Izotyp) | Oczekiwana kategoria [% stosunek] | N | Średnia [% stosunek] | SD [% stosunek] | CV [%] |
| anty-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 |
| anty-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 |
| anty-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 |

Tabela 12

### LoD i LoB

| Analit | LoB [% Stosunek] | LoD [% Stosunek] |
|---|---|---|
| Anty-GM1 IgM Ab | 5 | 21 |
| Anty-GM1 IgG Ab | 6 | 15 |
| Anty-MAG IgM Ab | 12 | 26 |
| Anty-MAG IgG/IgM Mix Ab | 14 | 27 |
| Anty-GQ1b IgM Ab | 3 | 17 |
| Anty-GQ1b IgG Ab | 8 | 18 |

Tabela 13

### Reaktywność krzyżowa

| Przypisane przeciwciało | Diagnostyka | # |
|---|---|---|
| Przeciwciało cytoplazmatyczne przeciwko neutrofilom (ANCA) | Zapalenie naczyń | 3 |
| | Inne (próbki ANCA oznaczone dodatnio) | 10 |
| Przeciwciała przeciwjądrowe (ANA) | Toczeń rumieniowaty układowy | 5 |
| | Reumatoidalne zapalenie stawów | 9 |
| | Zespół Sjogrena | 6 |
| | Inne (próbki ANA oznaczone dodatnio) | 3 |
| Przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie (anti-Tg) | Autoimmunologiczne zapalenie tarczycy | 5 |
| Przeciwciała przeciw rybonukleoproteinie | Mieszana choroba tkanki łącznej | 1 |
| Anty-GQ1b, anty-GM1, anty-GD1b | Autoimmunologiczne neuropatie obwodowe | 1 |
| Przeciwciała przeciw receptorowi acetylocholiny i kinaza tyrozynowa specyficzna dla mięśni | Miastenia gravis (Miastenia rzekomoporaźna | 7 |

Tabela 14

| Neuropatie obwodowe | # |
|---|---|
| Alkoholowa | 1 |
| Cukrzycowa | 5 |
| **Zaburzenia imitujące neuropatię obwodową** | **#** |
| Stwardnienie Zanikowe Boczne (ALS) | 15 |
| Sarkoidoza | 4 |
| Makroglobulinemia Waldenstroma (WM) | 4 |
| Choroba Chagasa | 5 |

Tabela 15

## TABELE I RYCINY

### Wydajność kliniczna

| Badanie | Kontrole pozytywne (Przyk-łady) | Kontrole negaty-wne | Epitop | Czułość | Specy-ficzność |
|---|---|---|---|---|---|
| Hashemilar et al., 2014 | Pediatrycz GBS (n = 45) | DC (n = 35) | GM1 | 0,51 | 0,89 |
| | | | GQ1b | 0,56 | 0,74 |
| Sharma et al., 2011 | Pediatric 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-neuropatia (n = 41) | NC (n = 112)<br>HC (n = 6) | HNK-1 (MAG) | 0,98 | 0,99 |

Tabela 16

GBS, Guillain-Barré-Syndrom; DC, Kontrola chorób nieneurologicznych; NC, Kontrola Neurologiczna; HC, Zdrowa Kontrola; MFS, Miller Fisher Syndrom; CIDP, Przewlekła zapalna polineuropatia demielinizacyjna

# BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA

**Wstępnie powlekana płytka do mikromiareczkowania**

↓ przepłukać *2 x przy użyciu ≥300 µL (zimnego!) buforu płuczącego*

**100 µL kalibratora, kontrole lub próbki surowicy (1:50)**

↓ *inkubować 2 godziny (±5 min) w 2-8 °C*

*przepłukać 3 x przy użyciu ≥300 µL (zimnego)! buforu płuczącego*

**dodać 100 µL enzymatycznych znaczników**

↓ *inkubować 2 godziny (±5 min) w 2-8 °C*

*przepłukać 3 x przy użyciu ≥300 µL (zimnego)! buforu płuczącego*

**dodać 100 µL substratu TMB (temperatura otoczenia)!**

↓ *inkubować 30 min (±2 min) w 18-28 °C na wytrząsarce do płytek przy ~400-600 rpm*

**dodać 100 µL roztworu zatrzymującego reakcję (temperatura otoczenia)!**

➡ **Odczytać absorbancję przy 450 nm (w ciągu 30 minut)**

## CZAS DO OTRZYMANIA WYNIKÓW: 4,5 GODZINY

## REFERENCJE


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).


## LISTA ZMIAN

| Data | Wersja | Zmiana |
|---|---|---|
| 2023-08-17 | A1 | Zmiana w rozdziale *Przeznaczenie* i w nazwie produktu<br>Usunięcie gangliozydu GM2 i wprowadzenie gangliozydu GT1a.<br>Przeformułowanie rozdziału *Zasada działania testu* poprzez wprowadzenie kategorii mian negatywnej, szarej strefy, pozytywnej<br>Nowe w użytku stabilności odczynników<br>Aktualizacja rozdziału *Środki ostrożności*<br>Korekta rozdziałów *Pobieranie próbek i ich przechowywanie, Procedura wykonania testu,* i *Standaryzacja i spójność pomiarowa*<br>Przeformułowanie rozdziałów *Kontrola Jakości*<br>*A*ktualizacja rozdziału *Ograniczenia*<br>Korekta rozdziałów *Przedziały referencyjne i wartości cut-off, Charakterystyka wydajności,* i *Substancje interferujące*<br>Wprowadzenie rozdziału *Wydajność kliniczna*<br>Korekta rozdziałów *Referencje* i *Symbole*<br>Włączenie numeru jednostki notyfikowanej do znaku CE – procedura oceny zgodności wg IVDR 2017/746 Korekta rozdziału *Symbole* |

## RAPORTOWANIE WYPADKÓW W PAŃSTWACH CZŁONKOWSKICH UE

W przypadku wystąpienia jakiegokolwiek poważnego wypadku z udziałem tego urządzenia, należy bezzwłocznie zgłosić to producentowi i właściwemu organowi państwa członkowskiego.

## USZKODZENIE PRZESYŁKI

Jeżeli produkt został uszkodzony należy poinformować o tym dystrybutora.

## SYMBOLE

Firma BÜHLMANN stosuje symbole i oznaczenia wymienione i opisane w normie ISO 15223-1. Dodatkowo stosowane są następujące symbole i oznaczenia:

| Symbol | Wyjaśnienie |
|---|---|
| MP | Płytka do mikromiareczkowania |
| BUF WASH 10X | Koncentrat buforu płuczącego (10x) |
| BUF INC | Bufor inkubacyjny |
| CAL | Kalibrator |
| CONTROL - | Kontrola Negatywna |
| CONTROL L | Kontrola Niska |
| CONTROL M | Kontrola Średnia |
| EL IgG | Znakowane enzymem IgG |
| EL IgM | Znakowane enzymem IgM |
| EL MIX | Znakowana mieszaniną enzymów IgG/IgM |
| SUBS TMB | SubstratTMB |
| SOLN STOP | Roztwór zatrzymujący reakcję |

CE 0123