BÜHLMANN
GanglioCombi® MAG ELISA

com marcadores enzimáticos IgG/IgM (mix), IgG e IgM

Detecção de anticorpos antigangliosídeos e antiMAG por ELISA

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

Para uso em diagnósticos *in vitro*

EK-GCM 2 x 96 testes

Data de lançamento: 2023-08-17
Versão A1

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

PORTUGUÊS

USO PRETENDIDO

O BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA é um teste de diagnóstico *in vitro* para a determinação semiquantitativa de anticorpos IgG e/ou IgM contra antígenos/epítopos neurais selecionados em amostras de soro. Os resultados do teste podem ser usados para respaldar o diagnóstico de neuropatias periféricas autoimunes, em conjunção com outros resultados clínicos e laboratoriais.
Somente para uso laboratorial.

INDICAÇÃO DE USO

Os três marcadores enzimáticos fornecidos com o kit possibilitam três algoritmos de teste diferentes:

1. O teste com o mix de conjugados IgG/IgM (doravante designado como mix) permite identificar a presença de anticorpos antineurais que sugerem uma possível neuropatia autoimune.
2. O teste com conjugados IgG e/ou IgM individuais permite a determinação de isotipos de anticorpos.
3. Para testes de laboratório, a triagem inicial de amostras usando o mix (opção 1) pode ser seguida pela diferenciação de amostras positivas do mix usando conjugados IgG e IgM individuais (opção 2), se necessário.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA permite medir anticorpos de gangliosídeos e da glicoproteína associada à mielina (MAG) no soro. A placa de microtitulação é revestida com gangliosídeos GM1, GT1a, GD1a, GD1b, GQ1b, e o epítopo HNK-1 quimicamente sintetizado da glicoproteína MAG (Ref. 1).
O soro dos pacientes, controles e o calibrador são adicionados aos poços da placa de microtitulação. Depois de 2 horas de incubação a 2-8 °C e de etapas de lavagem, anticorpos de detecção (anti-IgG/IgM, anti-IgG, e anti-IgM) conjugados a uma peroxidase de raiz forte (HRP), detectam os anticorpos antigangliosídeos e/ou antiMAG ligados a gangliosídeos ou ao HNK-1 imobilizados na placa. Depois de mais 2 horas de incubação e de etapas adicionais de lavagem, o substrato cromogênico da HRP, tetrametilbenzidina (TMB), é adicionado (formação da cor azul), seguido de uma solução de parada (mudança para a cor amarela). A absorção é medida a 450 nm.
A absorbância medida é proporcional ao título dos anticorpos presentes em uma determinada amostra. Os títulos dos anticorpos são expressos como Relações percentuais (%) do calibrador e podem receber categorias de títulos (negativo, zona cinza e positivo).

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Quantidade	Código	Reconstituição
Placa de microtitulação pré-revestida com gangliosídeos e HNK-1	2 x12 tiras x 8 poços com suporte	B-GCM-MP	Pronto para utilização
Selador da placa	6 unidades		
Concentrado do tampão de lavagem (10x) com conservantes	2 frascos x 100 mL	B-GCO-WB	Diluir com 900mL de água deionizada
Tampão de incubação com conservantes	1 frasco x 100 mL	B-GCO-IB	Pronto para utilização
Calibrador liofilizados, com conservantes	1 frasco	B-GCO-CA	Adicionar 1,5 mL de tampão de incubação
Controle negativo, baixo e medio[1] liofilizados, com conservantes	3 frascos	B-GCO-CONSET	Adicionar 1,5 mL de tampão de incubação
Mix de marcadores enzimáticos IgG/IgM Anticorpos IgG e IgM anti-humanos conjugados à HRP em uma matriz de tampão com conservantes	2 frascos x 11 mL	B-GCO-ELGM	Pronto para utilização
Marcador enzimático IgG Anticorpo anti-IgG humano conjugado à HRP em uma matriz de tampão com conservantes	1 frasco x 11 mL	B-GCO-ELG	Pronto para utilização
Marcador enzimático IgM Anticorpo anti-IgM humano conjugado à HRP em uma matriz de tampão com conservantes	1 frasco x 11 mL	B-GCO-ELM	Pronto para utilização
Substrato de TMB TMB em tampão de citrato	2 frascos x 11 mL	B-TMB	Pronto para utilização
Solução de parada Ácido sulfúrico 0,25 M	2 frascos x 11 mL	B-STS	Pronto para utilização **Agente corrosivo**

Tabela 1

[1] Os controles contêm níveis de anticorpos antiGM1 específicos a cada lote. Consulte a folha de dados de CQ adicional para obter a DO média e Relação % reais.

ARMAZENAMENTO PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

Reagentes selados / não abertos	
Guarde a uma temperatura na faixa de 2–8 °C. Não use os reagentes depois da data de validade impressa nos rótulos.	
Reagentes abertos / reconstituídos	
Placa de microtitulação	Retorne imediatamente as tiras não usadas para a embalagem aluminizada contendo os sachês de dessecante e torne a selar ao longo de toda a borda do fecho tipo zip. Guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2–8 °C.
Tampão de lavagem diluído	Guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2–8 °C.
Tampão de incubação	
Marcadores enzimático	
Substrato de TMB	
Calibrador	
Controles	
Solução de parada	Guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 18-28 °C.

Tabela 2

REAGENTES E MATERIAL FORNECIDO ADICIONALMENTE

- Pipetas de precisão com ponteiras descartáveis: pipetas de 10 µL, 20 µL, 100 µL e 1000 µL
- Tubos descartáveis de poliestireno ou polipropileno para a preparação de diluições de amostras.
- Cilindro de 1000 mL para a diluição do tampão de lavagem
- Lavador para a placa de microtitulação
- Papel mata-borrão
- Agitador da placa de microtitulação
- Leitor de placa de microtitulação para medição da absorbância a 450 nm

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Precauções de segurança

- O calibrador e controles deste kit contêm componentes de origem humana. Embora testados negativos para HBV, HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manuseados como se fossem capazes de transmitir infecções, sempre de acordo com Boas Práticas Laboratoriais (BPL) e usando-se as precauções apropriadas.
- Este kit contém componentes classificados de acordo com a Regulamentação (CE) n.º 1272/2008:
  - A solução de parada contém ácido sulfúrico (conc. 2,5–5%), portanto, os reagentes podem provocar irritação da pele (H315) e irritação ocular grave (H319), e podem ser corrosivos para metais (H290).
  - O calibrador, os controles e os marcadores enzimáticos contêm cloridrato de 2-metil-4-isotioazolin-3-ona (conc. ≥ 0,0015%), portanto, os reagentes podem provocar reações alérgicas na pele (H317).
  - O tampão de incubação e o tampão de lavagem contêm sulfato de gentamicina, portanto, os reagentes podem provocar reações alérgicas da pele (H317).
- Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente com quantidades abundantes de água; caso contrário, irritação ou queimaduras poderão ocorrer.
- Os reagentes e compostos químicos devem ser tratados como resíduos perigosos, em conformidade com as diretrizes ou regulamentações nacionais de segurança de riscos biológicos.

Precauções técnicas

- Leia atenciosamente as instruções antes de executar o teste. O desempenho dos testes será afetado negativamente se os reagentes forem diluídos incorretamente, modificados, ou armazenados em condições diferentes daquelas detalhadas nestas instruções de uso.

Procedimento ELISA

Temperatura dos reagentes

- Prepare os reagentes antes de iniciar o procedimento de teste. Etapas 3–9: Os reagentes utilizados nas etapas 3–9 devem estar frios (2–8 ˚C) e devem ser mantidos frios durante a pipetagem e lavagem. Recomendação: Prepare o tampão de lavagem no dia anterior à execução do teste e deixe-o no refrigerador a noite toda.
- Todas etapas de lavagem devem ser realizadas com o tampão de lavagem frio (2–8 ˚C).
- Deixe que o substrato de TMB e a solução de parada atinjam a temperatura ambiente (18–28 °C) no início do procedimento de teste.

Etapas de lavagem

- As etapas de lavagem 3, 6 e 9 são fundamentais para a remoção de resíduos gerados pelo processo de produção e/ou anticorpos potencialmente não ligados dos poços.
- Recomenda-se enfaticamente usar um lavador automático operando no “modo de placa”, i.e., cada etapa do processo (distribuição / aspiração) é executada em todas as tiras sequencialmente, antes que o instrumento passe para o próximo ciclo de lavagem.
- Certifique-se de que todos os poços estão completamente vazios depois do último ciclo de lavagem.

Incubação do substrato

- Etapa 11: Agite as placas de microtitulação durante a incubação com o substrato. Dependendo do modelo do agitador de placas, recomendamos 400–600 rpm. A solução deve se movimentar nos poços, mas sem derramar.

Componentes do kit

- Os componentes não devem ser usados depois da data de validade impressa nos rótulos.
- Não misture lotes diferentes de reagentes.
- Todas as providências devem ser tomadas para assegurar que não ocorra contaminação cruzada entre os reagentes, amostras ou entre poços.
- Os micropoços não podem ser reutilizados.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O procedimento requer menos de 0,1 mL de sangue ou menos de 50 µL de soro, respectivamente.

Colete o sangue em tubos simples para venopunção sem nenhum aditivo, e evite a hemólise. Execute a preparação do soro de acordo com as instruções do fabricante. Decante o soro.

As amostras de soro podem ser armazenadas a 2-8 °C por até oito semanas, a 28 °C por até uma semana, e a -20 °C ou abaixo por 16 semanas. As amostras congeladas devem ser descongeladas e misturadas bem por meio de movimentos circulares suaves ou inversão antes da utilização.

Recomendamos preparar alíquotas de amostras de soro antes do congelamento para evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.

PROCEDIMENTO

Existem duas opções:

(1) Detecção do isotipos do mix (IgG e IgM): adicione o mix de marcadores enzimáticos na etapa 7.

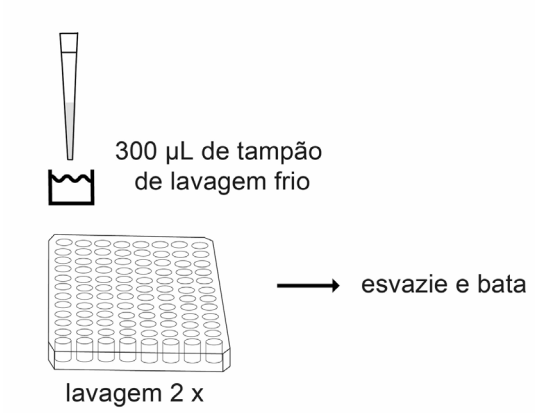
(2) Detecção de isotipos IgG ou IgM: adicione o marcador enzimático IgG ou o marcador enzimático IgM na etapa 7.

Nota: Deixe que a solução do substrato de TMB atinja a temperatura ambiente (18–28 °C).

1. Dilua as amostras a 1:50 com o tampão de incubação. Por exemplo, use 20 µL de soro + 980 µL de tampão de incubação frio (2-8 °C). Misture bem em agitador tipo vórtex e deixe as amostras diluídas e os calibradores e controles reconstituídos em repouso por 30 minutos a 2-8 °C antes de pipetar (consulte as etapas 4a e 4b).
2. Prepare um suporte de placa com tiras suficientes para testar a quantidade requerida de calibradores, controles e amostras. Remova o excesso de tiras do suporte e torne a selá-las sem demora na embalagem aluminizada, juntamente com os sachês de dessecante. Mantenha sob refrigeração.

Nota: Use reagentes frios nas etapas 3 a 9.

3. Lave os poços duas vezes, usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio (2-8 °C) por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão para remover completamente todo o líquido remanescente.



Nota: Proceda imediatamente com as próximas etapas.

4a. Pipete 100 µL de calibrador no poço A1 (consulte a Figura 1A para a opção 1, ou a Figura 1B para a opção 2).

4b. Pipete 100 µL de controle médio no poço B1, de controle baixo no poço A2 e de controle negativo no poço B2 (consulte as Figuras 1A ou 1B).

Nota para a opção 1: Caso sejam usadas mais de três tiras por corrida, o calibrador e os controles podem ser testados em duplicata (consulte a Figura 1A).

Nota para a opção 2: O calibrador e os controles devem ser processados separadamente para os isotipos IgG e IgM (consulte a Figura 1B).

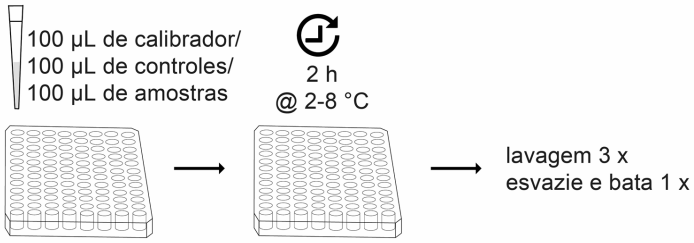
4c. Pipete 100 µL da amostra 1 diluída nos poços C1-H1 (consulte a Figura 1A ou 1B).

4d. Pipete 100 µL da amostra 2 diluída nos poços C2-H2 (consulte a Figura 1A ou 1B).

4e. Pipete 100 µL das amostras diluídas 3-24 (para a opção 1) ou 3-12 (para a opção 2) nos poços subsequentes (consulte a Figura 1A ou 1B).

Nota para a opção 2: repita a pipetagem das amostras 1-12 na mesma ordem nos poços remanescentes para o teste com o segundo isotipo.

5. Cubra a placa com um selador e incube por 2 horas (± 5 minutos) a 2–8 °C (não agite a placa).
6. Remova o selador da placa. Esvazie os poços e lave três vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio (2-8 °C) por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão para remover o tampão de lavagem completamente.



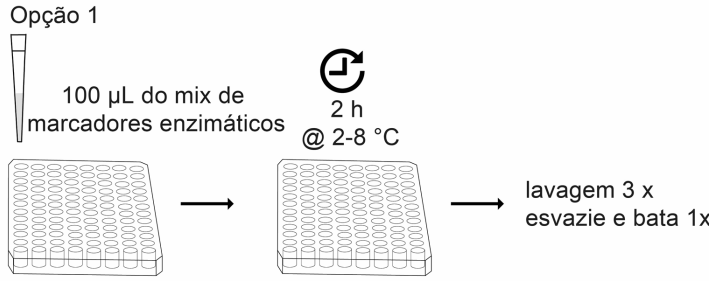
Para a opção 1: Detecção de isotipos do mix

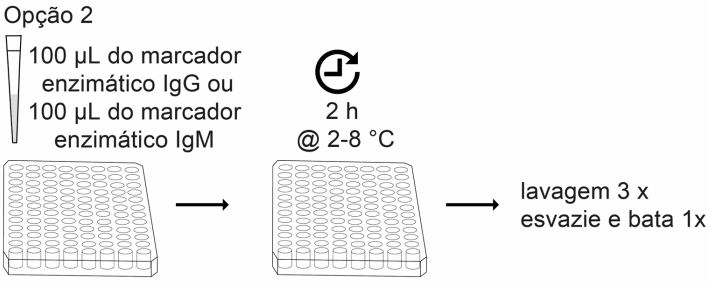
7. Adicione 100 µL do mix nos poços.

Para a opção 2: Detecção dos isotipos IgG e IgM

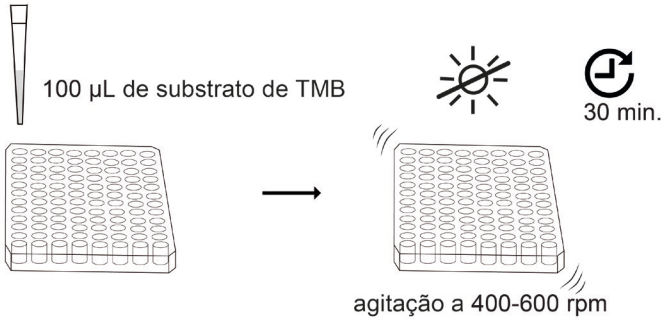
7'. Adicione 100 µL do marcador enzimático IgG ou IgM nos respectivos poços (consulte a Figura 1B).

8. Cubra a placa com um selador e incube por 2 horas (± 5 minutos) a 2–8 °C (não agite a placa).
9. Remova o selador da placa. Esvazie os poços e lave três vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio (2-8 °C) por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão.

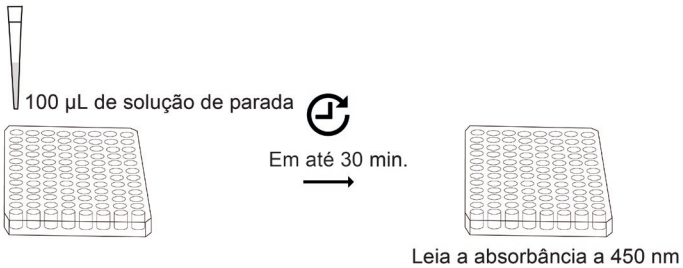




10. Adicione 100 µL de solução do substrato de TMB (equilibrada à temperatura ambiente) a cada poço.
11. Cubra a placa com um selador, proteja a placa contra luz e incube em um agitador de placas ajustado para 400–600 rpm a 18–28 °C por 30 ±2 minutos.



12. Adicione 100 µL de solução de parada a todos os poços. Remova bolhas de ar com a ponta de uma pipeta. Execute a etapa 13 dentro de até 30 minutos.
13. Leia a absorbância a 450 nm em um leitor de placa de microtitulação.



CONTROLE DE QUALIDADE

Para que se possa utilizar o produto com sucesso, é necessário compreender bem estas instruções de uso. Somente serão obtidos resultados confiáveis se técnicas laboratoriais precisas forem empregadas, seguindo-se estas instruções de uso à risca.
O kit BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA inclui três controles: negativo, baixo e médio. Faixas de valores (% Ratio) são atribuídas aos controles, conforme indicado na folha de dados de CQ fornecida com cada kit. As medições dos controles devem ficar dentro das faixas de valores indicadas para que resultados válidos sejam obtidos.
Em adição aos controles do kit, também recomendamos o uso de um pool de soros para fins de controle de qualidade interno.
Um valor mínimo de DO_{450nm} de 1,2 é recomendado para o calibrador.
As características de desempenho devem permanecer dentro dos limites estabelecidos. Se o desempenho do teste não atender aos limites estabelecidos e a repetição houver excluído erros de técnica, verifique os seguintes pontos: i) o controle de temperatura (reagentes usados nas etapas 3–9 mantidos a 2–8 °C); ii) a precisão dos termômetros, da pipetagem e dos dispositivos de cronometragem; iii) os ajustes do leitor ELISA; iv) as datas de validade dos reagentes; v) as condições de armazenamento e incubação; vi) a aparência da solução do substrato de TMB (deve ser incolor); vii) a pureza da água; e, viii) os métodos de aspiração e lavagem.

PADRONIZAÇÃO E RASTREABILIDADE METROLÓGICA

Não existem materiais de referência ou procedimentos de medição de referência reconhecidos internacional ou nacionalmente para anticorpos antigangliosídeos ou antiMAG em amostras de soro. O BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA é padronizado em relação a um material de referência estabelecido internamente. Os valores dos calibradores são atribuídos de acordo com um protocolo de transferência de valores (Ref. 2) para garantir a rastreabilidade metrológica, e são indicados em unidades arbitrárias de "Relação %".
O intervalo de confiança de 95% da incerteza combinada dos calibradores do produto foi determinado como 29,3% para anticorpos IgG e como 37,6% para anticorpos IgM.

CÁLCULOS E RESULTADOS

1. Registre a absorbância (DO) a 450 nm para cada poço (calibrador, controles e amostras).
2. Se várias medições do calibrador e dos controles tiverem sido realizadas, obtenha a média dos valores.

Os resultados são expressos em termos da relação entre a absorbância das amostras e a absorbância (média) do calibrador.

Isotipos do mix

$$\text{Relação \%:} \quad \frac{\text{absorbância das amostras ou controles}}{\text{absorbância do calibrador}} \times 200$$

Isotipos IgG e IgM

$$\text{Relação \%:} \quad \frac{\text{absorbância das amostras ou controles}}{\text{absorbância do calibrador}} \times 100$$

A maioria das leitoras de microplacas incluem programas para calcular os resultados como Relação %.

Nota: Os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 são exemplos fornecidos apenas para fins de demonstração.

LIMITAÇÕES

- Relações % altas nos resultados (> 100%) para os gangliosídeos individuais podem resultar em reatividade cruzada com outros gangliosídeos na mesma amostra. A reatividade cruzada tipicamente mostra uma alta variação interensaios. Assim sendo, a interpretação dos resultados deve ser feita somente em conjunto com um especialista.
- Devido à polirreatividade dos anticorpos autoimunes e a diferenças na prevalência geográfica, os resultados do teste devem ser usados apenas para respaldar a interpretação clínica da neuropatia por um especialista, em combinação com o quadro clínico do paciente (Ref. 3).
- Este teste ainda não foi validado para plasmaférese.
- Imunoglobulinas intravenosas (IVIg) podem afetar os resultados do teste.

INTERVALOS DE REFERÊNCIA E VALORES DE CORTE

O intervalo de referência do BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA foi determinado de acordo com a diretriz C28-A3 do CLSI, com 120 amostras de soro de indivíduos autodeclarados saudáveis. A distribuição de frequência dos anticorpos antigangliosídeos e antiMAG no sangue de

doadores normais foi classificada em categorias de título: negativo (Relação % < 30%), zona cinza (Relação % de 30-50%) e positivo (Relação % > 50%). Os resultados estão resumidos na Tabela 9. O valor de corte da positividade foi uma Relação % de 50%.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

<table>
<tr><th rowspan="3">Antígeno</th><th colspan="3">Mix de IgG/IgM</th></tr>
<tr><th colspan="3">Valores (Relação %)</th></tr>
<tr><th><30</th><th>30-50</th><th>>50</th></tr>
<tr><td>HNK-1</td><td rowspan="5">Negativo</td><td>Consulte a anotação */**</td><td>Consulte a anotação */**</td></tr>
<tr><td>GM1</td><td rowspan="5">Teste novamente num ponto de tempo posterior</td><td rowspan="5">Positivo</td></tr>
<tr><td>GT1a</td></tr>
<tr><td>GD1a</td></tr>
<tr><td>GD1b</td></tr>
<tr><td>GQ1b</td></tr>
</table>

Tabela 3

<table>
<tr><th rowspan="3">Antígeno</th><th colspan="3">IgG</th></tr>
<tr><th colspan="3">Valores (Relação %)</th></tr>
<tr><th><30</th><th>30-50</th><th>>50</th></tr>
<tr><td>HNK-1</td><td rowspan="5">Negativo</td><td>Consulte a anotação *</td><td>Consulte a anotação *</td></tr>
<tr><td>GM1</td><td rowspan="5">Teste novamente num ponto de tempo posterior</td><td rowspan="5">Positivo</td></tr>
<tr><td>GT1a</td></tr>
<tr><td>GD1a</td></tr>
<tr><td>GD1b</td></tr>
<tr><td>GQ1b</td></tr>
</table>

Tabela 4

<table>
<tr><th rowspan="3">Antígeno</th><th colspan="3">IgM</th></tr>
<tr><th colspan="3">Valores (Relação %)</th></tr>
<tr><th><30</th><th>30-50</th><th>>50</th></tr>
<tr><td>HNK-1</td><td rowspan="5">Negativo</td><td>Consulte a anotação **</td><td>Positivo (consulte a anotação **)</td></tr>
<tr><td>GM1</td><td rowspan="5">Teste novamente num ponto de tempo posterior</td><td rowspan="5">Positivo</td></tr>
<tr><td>GT1a</td></tr>
<tr><td>GD1a</td></tr>
<tr><td>GD1b</td></tr>
<tr><td>GQ1b</td></tr>
</table>

Tabela 5

Os resultados dos testes devem ser interpretados em conjunto com informações disponíveis da avaliação clínica do paciente e de outros procedimentos de diagnóstico.
* A neuropatia MAG é comumente associada à presença de anticorpos antiMAG do isotipo IgM (Ref. 4).
** Os resultados entre 30 e 50% (zona cinza) ou > 50% (positivos) para HNK-1 obtidos com o mix ou com o marcador enzimático IgM podem ser testados novamente com o antiMAG Antibodies ELISA (EK-MAG).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Comparação de métodos

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA vs antiMAG Antibodies ELISA

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com as diretrizes EP09-A3 e EP12-A2 do CLSI. Cento e vinte duas (122) amostras foram medidas usando-se 2 lotes do BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA e 2 lotes do antiMAG Antibodies ELISA. A concordância de diagnóstico (kappa), o percentual de concordância positiva e o percentual de concordância negativa foram determinados. As concordâncias podem ser encontradas na Tabela 10.

Precisão intralaboratorial

Para os antigangliosídeos: 5,7 – 13,2% do CV
Para os antiMAG: 14,4 – 36,5% do CV

A precisão intralaboratorial foi determinada de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se o arranjo de estudo padronizado de 20 dias x 2 corridas x 2 replicatas. Três (3) amostras de soro de pacientes agrupadas foram testadas. Os resultados estão resumidos na Tabela 11.

Reprodutibilidade

Para os antigangliosídeos: 7,7 – 19,1% do CV
Para os antiMAG: 23,5 – 33,2% do CV

A reprodutibilidade foi determinada de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo de 3 instrumentos/lotes/operadores x 5 dias x 5 replicatas. Três (3) amostras de soro de pacientes agrupadas foram testadas. Os resultados estão resumidos na Tabela 12.

Limite do branco (LoB) ≤ Limite de detecção (LoD): ≤ Relação % de 30%

O LoB e o LoD foram determinados de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, utilizando-se análise não paramétrica. Os resultados estão resumidos na Tabela 13.

Efeito gancho com dose elevada

Não se observou nenhuma limitação por efeito gancho de dose elevada sobre a faixa de medição.

Reatividade cruzada

Não se observou nenhuma reatividade cruzada para amostras de pacientes com diferentes doenças autoimunes (Tabela 14) e de pacientes com outros distúrbios neurológicos (Tabela 15).

DESEMPENHO CLÍNICO

O desempenho clínico foi avaliado por meio do resumo de análises da literatura científica revisada por pares. Seis (6) estudos abordaram o desempenho clínico do BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA no diagnóstico de neuropatias periféricas autoimunes (Ref. 5-10). Os resultados das análises e os detalhes dos estudos podem ser encontrados na Tabela 6 e na Tabela 16, respectivamente.

N.º de neuropatias periféricas	201 (102 SGBs pediátricas, 14 PDICs, 44 SGBs e 41 neuropatias antiMAG)
N.º de controles	493 (104 CD, 254 CN, 135 CS)
Sensibilidade (95% do IC)	68,1% (39,6 – 87,5%)
Especificidade (95% do IC)	88,0% (72,3 – 95,3%)
AUC DA CURVA ROC	0,85

Tabela 6

SGB – Síndrome de Guillain-Barré; CD – controle sem doença neurológica; CN – controle neurológico; CS – controle saudável; PDIC – polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica; IC – intervalo de confiança; AUC da curva ROC – área sob a curva característica de operação do receptor.

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

A suscetibilidade do teste a produtos farmacêuticos orais e injetáveis, bem como a substâncias endógenas, foi avaliada de acordo com a diretriz EP07-A3 do CLSI. Desvios superiores a uma Relação % de ±20% nos resultados foram considerados como interferências.

Nenhuma interferência foi detectada com as seguintes substâncias até as concentrações listadas: imunoglobulina intravenosa (20 mg/mL), rituximabe (3 mg/mL), cladribina (273 ng/mL), interferon alfa-2a (49,5 ng/mL), gabapentina (26,7 µg/mL), ibuprofeno (0,22 mg/mL), clorambucil (1,96 µg/mL), prednisona (99 ng/mL), prednisolona (1,2 µg/mL), fator reumatoide (2340 UI/mL), hemoglobina (10 mg/mL), hemolisado (10 mg/mL), triglicérides (15 mg/mL), bilirrubina conjugada (20 mg/mL), bilirrubina não conjugada (150 mg/mL).

TABELAS E FIGURAS

Preparação da placa de microtitulação : Mix de marcadores IgG/IgM

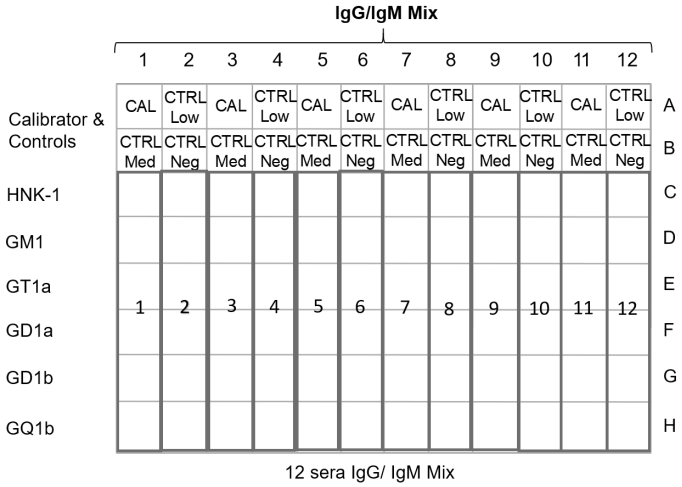


Figura 1A: ≤ 24 soros / kit (2 MP / kit)

Preparação da placa de microtitulação: Marcadores IgG e IgM

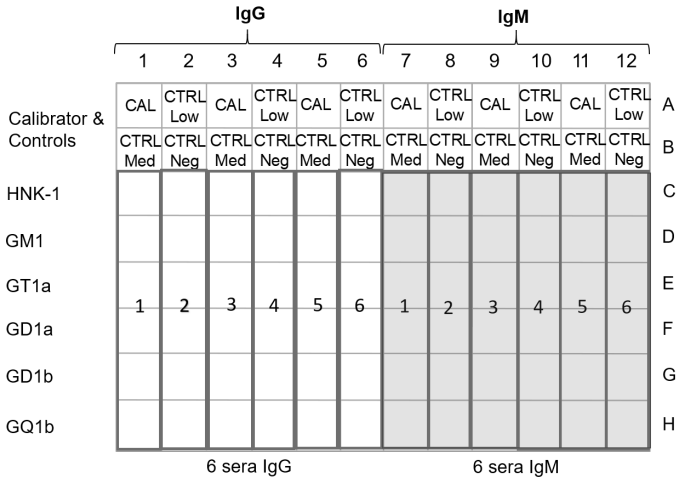


Figura 1B: 2 perfis / soro, ≤ 12 soros / kit (2 MP / kit)

Exemplo de resultados

A Mix de marcadores IgG/IgM

B-GCO-ELGM	Absorbância (DO450)	Relação [%]
Calibrador Calibrador, média	2,179 2,477 2,328	 100
Controle médio Controle médio, média	1,737 1,891 1,814	 78
Controle baixo Controle baixo, média	0,662 0,460 0,561	 24
Controle negativo Controle negativo, média	0,044 0,046 0,045	 2
Amostra 1 HNK-1	0,234	10
Amostra 1 GM1	0,543	23
Amostra 1 GT1a	1,976	85
Amostra 1 GD1a	0,621	27
Amostra 1 GD1b	0,734	32
Amostra 1 GQ1b	2,573	111

Tabela 7

B Marcadores IgG e IgM

Marcador enzimático	Absorbância (DO450)		Relação [%]	
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM	IgG	IgM	IgG	IgM
Calibrador Calibrador, média	2,488 2,446 2,467	2,411 2,201 2,306	 100	 100
Controle médio Controle médio, média	1,879 1,987 1,933	1,734 1,818 1,776	 78	 77
Controle baixo Controle baixo, média	0,452 0,716 0,584	0,501 0,609 0,555	 24	 24
Controle negativo Controle negativo, média	0,045 0,037 0,041	0,048 0,042 0,045	 2	 2
Amostra 1 HNK-1	0,423	0,621	17	27
Amostra 1 GM1	2,001	2,102	81	91
Amostra 1 GT1a	0,521	0,237	21	10
Amostra 1 GD1a	1,984	0,821	80	36
Amostra 1 GD1b	0,473	1,923	19	83
Amostra 1 GQ1b	0,094	0,911	4	40

Tabela 8

TABELAS E FIGURAS

Intervalo de referência

Analito	% de doadores com sangue normal nas categorias			Limite de referência (90% do IC)
	Relação % < 30	Relação % 30 - 50	Relação % > 50	
IgG antiMAG	96,7	2,5	0,8	25 (15,7 – 39,5)
IgM antiMAG	99,2	0,8	0,0	20 (18.6 – 28,4)
IgGM antiMAG	86,7	10,0	3,3	44 (34,8 – 52,9)
IgG antiGM1	99,2	0,8	0,0	16 (13,0 – 29,8)
IgM antiGM1	95,8	3,3	0,8	24 (14,3 – 40,3)
IgGM antiGM1	95,0	4,2	0,8	34 (23,3 – 49,5)
IgG antiGT1a	90,0	6,7	3,3	44 (35,9 – 113,1)
IgM antiGT1a	97,5	2,5	0,0	16 (10,3 – 31,8)
IgGM antiGT1a	85,0	10,0	5,0	50 (42,4 – 140,3)
IgG antiGD1a	91,7	5,0	3,3	42 (26,2 – 108,2)
IgM antiGD1a	100,0	0,0	0,0	8 (6,6 – 12,4)[F] 18 (6,6 – 24,3)[M]
IgGM antiGD1a	88,3	5,8	5,8	53 (35,0 – 118,7)
IgG antiGD1b	97,5	1,7	0,8	21 (14,5 – 33,0)
IgM antiGD1b	99,2	0,0	0,8	15 (6,3 – 15,5)[F] 9 (6,4 – 54,7)[M]
IgGM antiGD1b	95,0	3,3	1,7	30 (22,3 – 71,6)
IgG antiGQ1b	97,5	2,5	0,0	24 (14,6 – 33,4)
IgM antiGQ1b	99,2	0,8	0,0	8 (6,2 – 17,8)
IgGM antiGQ1b	95,0	4,2	0,8	31 (23,1 – 46,7)

F subgrupo de mulheres. *M* subgrupo de homens

Tabela 9

Comparação de métodos: anticorpos antiMAG

Descrição	N.º	Concordância kappa		PCN		PCP	
		Valor	95% do IC	Valor	95% do IC	Valor	95% do IC
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

PCN: Percentual de concordância negativa
PCP: Percentual de concordância positiva
IC: Intervalo de confiança

Precisão intralaboratorial

Descrição da amostra			Precisão intralaboratorial			
Analito	Marcador enzimático (isotipo)	Categoria esperada [Relação %]	N.º	Média [Relação %]	DP [Relação %]	CV [%]
Ac antiGM1	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
Ac antiGQ1b	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
Ac antiMAG	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

Reprodutibilidade:

Descrição da amostra			Reprodutibilidade			
Analito	Marcador enzimático (isotipo)	Categoria esperada [Relação %]	N.º	Média [Relação %]	DP [Relação %]	CV [%]
Ac antiGM1	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
Ac antiGQ1b	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
Ac antiMAG	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 e LoB

Analito	LoB [Relação %]	LoD [Relação %]
Ac IgM antiGM1	5	21
Ac IgG antiGM1	6	15
Ac IgM antiMAG	12	26
Ac mix de IgG/IgM antiMAG	14	27
Ac IgM antiGQ1b	3	17
Ac IgG antiGQ1b	8	18

Tabela 13

Reatividade cruzada

Anticorpo atribuído	Diagnóstico	#
Anticorpo anticitoplasmático de neutrófilo (ANCA)	Vasculite	3
	Outros (amostras indicadas positivas para ANCA)	10
Anticorpos antinucleares (ANA)	Lúpus eritematoso sistêmico	5
	Artrite reumatoide	9
	Síndrome de Sjögren	6
	Outros (amostras indicadas positivas para ANA)	3
Anticorpos antitireoglobulina (anti-Tg)	Tireoidite autoimune	5
Anticorpos antirribonucleoproteína	Doenças difusas do tecido conectivo	1
Anti-GQ1b, anti-GM1 e anti-GD1b	Neuropatias periféricas autoimunes	1
Anticorpos antirreceptores da acetilcolina e antitirosina quinase muscular específica	Miastenia gravis	7

Tabela 14

Neuropatias periféricas	#
Alcoólatras	1
Diabéticos	5
Distúrbios que se assemelham a neuropatias periféricas	**#**
Esclerose lateral amiotrófica (ELA)	15
Sarcoidose	4
Macroglobulinemia de Waldenström (MW)	4
Doença de Chagas	5

Tabela 15

TABELAS E FIGURAS

Desempenho clínico

Estudo	Controles positivos (casos)	Controles negativos	Epítopos	Sensi-bilidade	Especi-ficidade
Hashemilar et al., 2014	SGB pediátrica (n = 45)	CD (n = 35)	GM1	0,51	0,89
			GQ1b	0,56	0,74
Sharma et al., 2011	SGB pediátrica (n = 57)	CN (n = 42)	GM1	0,82	0,33
		CD (n = 35)			0,83
Khandelwal et al., 2006	SGB (n = 13)	CS (n = 19)	GM1	0,31	0,74
Uetz-von Allmen et al., 1998	SGB, PDIC (n = 19, 14)	CN (n = 100)	GM1	0,30	0,93
		CS (n = 110)			0,95
Spatola et al., 2016	SGB (SMF) (n = 12)	CD (n = 34)	GQ1b	0,92	0,97
Delmont et al., 2019	Neuropatia MAG (n = 41)	CN (n = 112) CS (n = 6)	HNK-1 (MAG)	0,98	0,99

Tabela 16

SGB – Síndrome de Guillain-Barré; CD – controle sem doença neurológica; CN – controle neurológico; CS – controle saudável; SMF – Síndrome de Miller-Fisher; PDIC – polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica.

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA

Placa de microtitulação pré-revestida

↓ *lave 2 x com 300 µL ou mais de tampão de lavagem (frio!)*

100 µL de calibrador, controles ou amostras de soro (1:50)

↓ *incube por 2 horas (±5 minutos) a 2-8 °C*

lave 3 x com 300 µL ou mais de tampão de lavagem (frio!)

adicione 100 µL de marcador(es) enzimático(s)

↓ *incube por 2 horas (±5 minutos) a 2-8 °C*

lave 3 x com 300 µL ou mais de tampão de lavagem (frio!)

adicione 100 µL de substrato de TMB (à temperatura ambiente)!

↓ *incube por 30 minutos (±2 minutos) a 18-28 °C em um agitador de placas a ~400-600 rpm*

adicione 100 µL da solução de parada (à temperatura ambiente)!

➡ **Leia a absorbância a 450 nm (dentro de 30 minutos)**

TEMPO ATÉ OBTER OS RESULTADOS: 4,5 HORAS

REFERÊNCIAS

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).

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Data	Versão	Alteração
2023-08-17	A1	Alteração da *Uso pretendido* e do nome do produto Remoção do gangliosídeo GM2 e introdução do gangliosídeo GT1a Reformulação da redação do *Princípio do ensaio* com as categorias de título negativa, zona cinza e positiva Novo texto de estabilidades de uso dos reagentes Atualização do capítulo *Advertências e precauções* Revisão dos capítulos *Coleta e armazenamento de amostras, Procedimento,* e *Padronização e rastreabilidade metrológica* Reformulação da redação do capítulo *Controle de qualidade* Atualização do capítulo *Limitações* Revisão dos capítulos *Intervalos de referência e valores de corte, Características de desempenho,* e *Substâncias interferentes* Adição do capítulo *Desempenho clínico* Revisão dos capítulos *Referências,* e *Símbolos* Inclusão do número do órgão notificado na marcação CE - procedimento de avaliação de conformidade, de acordo com a regulamentação IVDR 2017/746 Revisão do capítulo *Símbolos*

NOTIFICAÇÃO DE INCIDENTES EM ESTADOS-MEMBROS DA UE

Se algum incidente sério ocorrer associado a este dispositivo, notifique sem demora o fato ao fabricante e à autoridade competente de seu Estado-Membro.

DANOS DE TRANSPORTE

Informe seu distribuidor caso o produto seja recebido danificado.

SIMBOLOS

BÜHLMANN utiliza símbolos e sinais listados e descritos na ISO 15223-1. Além disso, são utilizados os seguintes símbolos e letreiros:

Símbolo	Explicação
MP	Placa de microtitulação
BUF WASH 10X	Tampão de lavagem concentrado (10x)
BUF INC	Tampão de incubação
CAL	Calibrador
CONTROL -	Controle negativo
CONTROL L	Controle baixo
CONTROL M	Controle medio
EL IgG	Marcador enzimático IgG
EL IgM	Marcador enzimático IgM
EL MIX	Mix de marcadores enzimáticos IgG/IgM
SUBS TMB	Substrato de TMB
SOLN STOP	Solução de parada

CE 0123