



BÜHLMANN GanglioCombi[®] MAG ELISA

s enzymovými značkami IgG/IgM Mix, IgG a IgM

Detekce protilátek anti-gangliosid
a -MAG metodou ELISA
(HNK-1 ("MAG"), GM1, GT1a, GD1a, GD1b a GQ1b)

Pro in vitro diagnostiku

EK-GCM 2 x 96 testů

Datum vydání: 2026-05-04
Verze A3



BÜHLMANN Laboratories AG

Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Švýcarsko
Tel.: +41 61 487 12 12
Fax: +41 61 487 12 34
info@buhlmannlabs.ch

URČENÉ POUŽITÍ

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA je *in vitro* diagnostický test k semikvantitativnímu stanovení protilátek IgG a, nebo IgM proti vybraným nervovým antigenům/epitopům ve vzorcích séra od pacientů se suspektní nebo diagnostikovanou autoimunitní periferní neuropatií. Výsledky testu lze použít k podpoře diagnózy autoimunitních periferních neuropatií ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními nálezy.

Pouze k laboratornímu použití zdravotnickým personálem. Neautomatizováno.

ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Tři enzymové značky dodávané v sadě umožňují tři různé testovací algoritmy:

1. Testování pomocí směsi konjugátů IgG/IgM (dále jen "směs") umožňuje vyšetřit přítomnost antineurálních protilátek naznačujících autoimunitní neuropatii.
2. Testování s jednotlivými konjugáty IgG a/nebo IgM umožňuje stanovit izotyp protilátek.
3. Při laboratorním zpracování může po počátečním screeningu vzorků pomocí směsi (možnost 1) následovat v případě potřeby diferenciací vzorků pozitivních na směs pomocí jednotlivých konjugátů IgG a IgM (možnost 2).

PRINCIP TESTU

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA umožňuje měření protilátek proti gangliosidům a glykoproteinu asociovanému s myelinem (MAG) v séru. Mikrotitrační destička je potažena gangliosidy: GM1, GT1a, GD1a, GD1b, GQ1b a chemicky syntetizovaným epitopem HNK-1 glykoproteinu MAG (ref. 1).

Do jamek mikrotitrační destičky se přidají séra pacientů, kontroly a kalibrátor. Po 2 hodinách inkubace při 2-8 °C a promytí se detekčními protilátkami (anti-IgG/IgM, anti-IgG, anti-IgM) konjugovanými s křenovou peroxidázou (HRP) detekují protilátky proti gangliosidům a/nebo anti-MAG navázané na imobilizované gangliosidy nebo HNK-1 na destičce. Po dalších 2 hodinách inkubace a dalších promývacích krocích se přidá chromogenní substrát HRP, tetrametylbenzidin (TMB) (tvorba modré barvy) a následuje zastavení reakce (změna na žlutou barvu). Absorbance se měří při 450 nm.

Naměřená absorbance je úměrná titru protilátek přítomných v daném vzorku. Titry protilátek se vyjadřují jako % poměru ke kalibrátoru a lze je přiřadit ke kategoriím titrů (negativní, šedá zóna, pozitivní).

DODÁVANÉ REAGENCIE A PŘÍPRAVA

| Reagencie | Množství | Kat.č. | Příprava |
|---|-----------------------------|--------------|---|
| Mikrotitrační destička předem potažená gangliosidy a HNK-1 | 2 x 12 x 8 jamek s rámečkem | B-GCM-MP | Připraveno k použití |
| Lepicí fólie | 6 kusy | | |
| Konzentrát promývacího roztoku (10x) s konzervačními látkami | 2 láhve x 100 mL | B-GCO-WB | Zředte 900 mL deionizované vody |
| Inkubační roztok s konzervačními látkami | 1 láhev x 100 mL | B-GCO-IB | Připraveno k použití |
| Kalibrátory lyofilizované s konzervačními látkami | 1 lahvička | B-GCO-CA | Přidejte 1,5 mL inkubačního roztoku |
| Kontroly negativní, nízká a střední ¹ lyofilizované s konzervačními látkami | 3 lahvičky | B-GCO-CONSET | Přidejte 1,5 mL inkubačního roztoku |
| Směs IgG/IgM označená enzymem protilátky proti lidskému IgG a IgM konjugované s HRP v matrici pufru s konzervačními látkami | 2 lahvičky x 11 mL | B-GCO-ELGM | Připraveno k použití |
| Enzymová značka IgG protilátka proti lidskému IgG konjugovaná s HRP v roztoku s konzervačními látkami | 1 lahvička x 11 mL | B-GCO-ELG | Připraveno k použití |
| Enzymová značka IgM protilátka proti lidskému IgM konjugovaná s HRP v roztoku s konzervačními látkami | 1 lahvička x 11 mL | B-GCO-ELM | Připraveno k použití |
| Substrát TMB TMB v citrátovém pufru | 2 lahvičky x 11 mL | B-TMB | Připraveno k použití |
| Zastavovací roztok 0,25 M kyselina sírová | 2 lahvičky x 11 mL | B-STTS | Připraveno k použití Žíravina |

Tabulka 1

¹ Kontroly obsahují množství protilátek anti-GM1 specifické pro danou šarži. Skutečné průměrné hodnoty OD a % poměru jsou uvedeny v doplňkovém listu pro kontrolu kvality.

SKLADOVÁNÍ A ŽIVOTNOST REAGENCIÍ

| Zapečetěná/ neotevřená činidla | |
|--|---|
| Skladujte při teplotě 2-8 °C. Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích. | |
| Otevřená/ zředěná činidla | |
| Mikrotitrační destička | Nepoužité stripy ihned vraťte do fóliového sáčku s vysoušecími balíčky a znovu je uzavřete podél celého okraje zipu. Skladujte až 6 měsíců při teplotě 2-8 °C. |
| Zředěný promývací roztok | Skladujte až 6 měsíců při teplotě 2-8 °C. |
| Inkubační roztok | |
| Enzymové značky | |
| Substrát TMB | |
| Kalibrátor | |
| Kontroly | |
| Zastavovací roztok | Skladujte až 6 měsíců při teplotě 18-28 °C. |

Tabulka 2

POŽADOVANÉ MATERIÁLY NEDODÁVANÉ SE SOUPRAVOU

- Přesné pipety s jednorázovými špičkami: 10 µL, 20 µL, 100 µL a 1000 µL
- Jednorázové polystyrenové nebo polypropylenové zkušavky pro přípravu ředění vzorků
- 1000 mL láhev pro ředění promývacího roztoku
- Podložka pod mikrotitrační destičky
- Blotovací papír
- Třepačka mikrotitračních destiček
- Čtečka mikrotitračních destiček pro měření absorbance při 450 nm

UPOZORNĚNÍ A OPATŘENÍ

Bezpečnostní opatření

- Kalibrátor a kontroly této soupravy obsahují složky lidského původu. Přestože byly testovány a sledovány negativními na HBV, HCV a HIV1/2, mělo by se s činnidly zacházet, jako s potenciálně infekčními, a mělo by se s nimi zacházet v souladu se správnou laboratorní praxí (SLP) za použití vhodných bezpečnostních opatření.
- Tato sada obsahuje součásti klasifikované v souladu s nařízením (ES) č. 1272/2008:
 - Zastavovací roztok obsahuje kyselinu sírovou (konc. 2,5-5 %), proto může dráždit kůži (H315), způsobit vážné podráždění očí (H319) a může být korozivní pro kovy (H290).
 - Kalibrátor, kontroly a enzymové značky obsahují 2-methyl-4-isothiazolin-3-on hydrochlorid (konc. $\geq 0,0015\%$), proto mohou činnidla vyvolat alergické kožní reakce (H317).
 - Inkubační roztok a promývací roztok obsahují gentamicin sulfát, proto mohou tato činnidla vyvolat alergickou kožní reakci (H317).
- Zabraňte kontaktu činnidel s kůží, očima nebo sliznicemi. Dojde-li ke kontaktu s činnidlem, okamžitě je omyjte velkým množstvím vody, jinak může dojít k podráždění/popálení.
- S činnidly a chemikáliemi se musí zacházet jako s nebezpečným odpadem podle národních bezpečnostních směrnic nebo nařízení o biologickém nebezpečí.

Technická opatření

- Před provedením testu si pečlivě přečtete pokyny. Pokud jsou činnidla nesprávně naředěna, upravena nebo skladována za jiných podmínek, než je uvedeno v tomto návodu k použití, bude to mít nepříznivý vliv na výsledky testu.

ELISA postup

Teplota činnidel

- Před zahájením postupu analýzy si připravte činnidla. Kroky 3-9: Reagencie používané v krocích 3-9 musí být chlazené (2-8 °C) a při pipetování a promývání musí být uchovávány v chladu. Doporučení: Doporučujeme připravit promývací roztok den před provedením testu a umístit jej přes noc do chladničky.
- Všechny promývací kroky provádějte se studeným (2-8 °C) promývacím roztokem.

- Na začátku postupu analýzy upravte substrát TMB a zastavovací roztok na pokojovou teplotu (18-28 °C).

Kroky promývání

- Promývací kroky 3, 6 a 9 mají zásadní význam pro odstranění zbytků vzniklých při výrobním procesu a/nebo potenciálně nenavázaných protilátek v jamkách.
- Důrazně se doporučuje automatická promývačka pracující v "režimu desek", tj. každý procesní krok (dávkování/aspirace) se provede postupně na všech stripech, než přístroj pokračuje dalším promývacím cyklem.
- Po posledním promývacím cyklu se ujistěte, že jsou všechny jamky zcela prázdné.

Inkubace substrátu

- Krok 11: Během inkubace se substrátem mikrotitrační destičky protřepejte. V závislosti na modelu třepačky destiček doporučujeme 400-600 otáček za minutu. Roztok by se měl v jamkách pohybovat, ale nesmí se přelévat.

Součásti sady

- Složky se nesmí používat po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích.
- Nezaměňujte různé šarže činnidel.
- Je třeba vynaložit veškeré úsilí, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi činnidly, vzorky nebo jamkami.
- Mikrotitrační jamky nelze použít opakovaně.

ODBĚR A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

K postupu je zapotřebí < 0,1 mL krve, resp. < 50 µL séra.

Krev odebírejte do obyčejných venepunkčních zkušavek bez jakýchkoli přísad a zabraňte hemolýze. Přípravu séra proveďte podle pokynů výrobce. Sérum dekantujte.

Vzorky séra lze skladovat při teplotě 2-8 °C až osm týdnů, při 28 °C až týden a při ≤ -20 °C až 25 měsíců. Zmrazené vzorky je třeba před použitím rozmrazit a důkladně promíchat jemným otáčením nebo převrácením.

Doporučujeme připravit alikvoty vzorků séra před zmrazením, aby se předešlo opakovaným cyklům zmrazení/rozmrazení.

POSTUP TESTU

Existují dvě možnosti:

- (1) Detekce směsných izotypů (IgG a IgM): v kroku 7 přidejte směs enzymové značky.
- (2) Detekce izotypů IgG nebo IgM: přidejte buď enzymovou značku IgG, nebo enzymovou značku IgM v kroku 7.

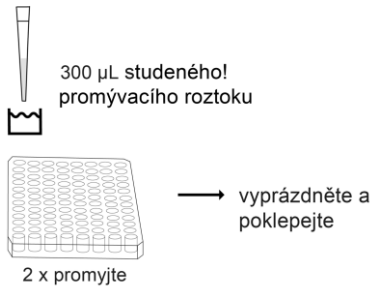
Poznámka: Roztok substrátu TMB upravte na pokojovou teplotu (18-28 °C).

1. Vzorky nařeďte v poměru 1:50 s inkubačním roztokem. Použijte např. 20 µL séra + 980 µL studeného! (2-8 °C) inkubačního pufru. Důkladně promíchejte vortexováním a naředěné vzorky i rekonstituovaný kalibrátor a kontroly nechte před pipetováním 30 minut při teplotě 2-8 °C (viz krok 4a a b).
2. Připravte si rámeček s dostatečným počtem stripů pro testování požadovaného počtu kalibrátorů, kontrol a

vzorků. Odstraňte přebytečné stripy z rámečku a neprodleně je znovu uzavřete do fóliového sáčku spolu s vysoušedlem. Uchovávejte v chladu.

Poznámka: V krocích 3 až 9 použijte studená činidla.

- Jamky dvakrát promyjte alespoň 300 μL studeného! (2-8 $^{\circ}\text{C}$) promývacího roztoku na jamku. Vyprázdněte jamky a pevně poklepejte destičkou na papír, abyste zcela odstranili zbývající tekutinu.



Poznámka: Okamžitě přejděte k dalším krokům.

- Do jamky A1 napipetujte 100 μL kalibrátoru (viz obrázek 1A pro možnost 1 nebo obrázek 1B pro možnost 2).
- Do jamky B1 napipetujte 100 μL střední kontroly, do jamky A2 nízkou kontrolu a do jamky B2 negativní kontrolu (viz obrázek 1A nebo 1B).

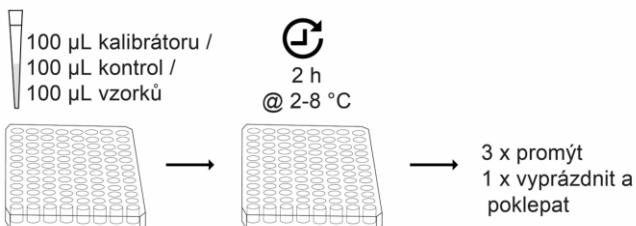
Poznámka k variantě 1: Pokud se v jedné sérii používají více než tři stripy, lze kalibrátor a kontroly testovat duplicitně (viz obrázek 1A).

Poznámka k variantě 2: Kalibrátor a kontroly by se měly testovat odděleně pro izotypy IgG a IgM (viz obrázek 1B).

- Do jamek C1-H1 (viz obrázek 1A nebo 1B) napipetujte 100 μL naředěného vzorku 1.
- Do jamek C2-H2 (viz obrázek 1A nebo 1B) napipetujte 100 μL naředěného vzorku 2.
- Do následujících jamek (viz obrázek 1A nebo 1B) napipetujte 100 μL naředěných vzorků 3-24 (pro možnost 1) nebo 3-12 (pro možnost 2).

Poznámka k variantě 2: pro testování s druhým izotypem opakujte pipetování vzorků 1-12 ve stejném pořadí do zbývajících jamek

- Přikryjte destičku lepicí fólií a inkubujte po dobu 2 hodin (± 5 min) při teplotě 2-8 $^{\circ}\text{C}$ (destičkou netřepejte).
- Sejměte lepicí fólii z destičky. Vyprázdněte jamky a třikrát je promyjte pomocí nejméně 300 μL studeného! (2-8 $^{\circ}\text{C}$) promývacího roztoku na jamku. Vyprázdněte jamky a pevně poklepejte destičkou na blotovací papír, aby se promývací roztok zcela odstranil.



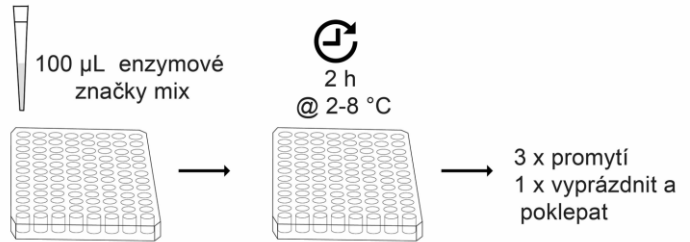
Pro variantu 1: Detekce mix-izotypu

- Do jamek přidejte 100 μL směsi.

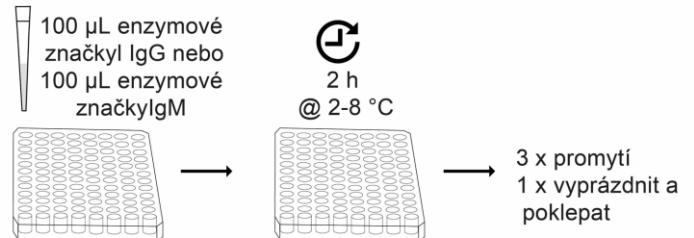
Pro variantu 2: Detekce izotypů IgG nebo IgM

- Do příslušných jamek přidejte 100 μL enzymem značeného IgG nebo IgM (viz obrázek 1B).
- Přikryjte destičku lepicí fólií a inkubujte po dobu 2 hodin (± 5 min) při teplotě 2-8 $^{\circ}\text{C}$ (destičkou netřepejte).
- Sejměte lepicí fólii z destičky. Vyprázdněte jamky a třikrát je promyjte pomocí nejméně 300 μL studeného! (2-8 $^{\circ}\text{C}$) promývacího roztoku na jamku. Vyprázdněte jamky a pevně poklepejte destičkou na blotovací papír.

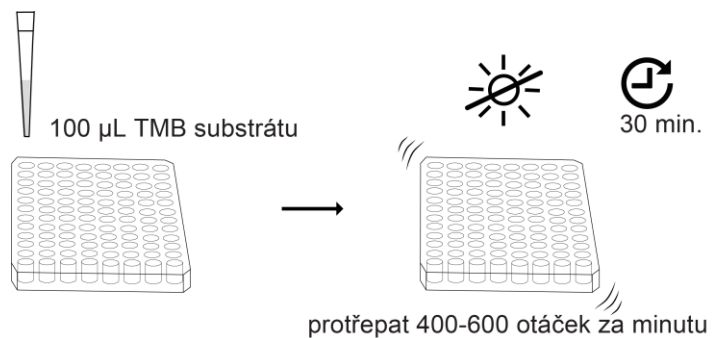
Pro variantu 1



Pro variantu 2



- Do každé jamky přidejte 100 μL roztoku substrátu TMB (ekvibrováno na pokojovou teplotu).
- Přikryjte destičku lepicí fólií, chraňte ji před světlem a inkubujte na třepačce nastavené na 400-600 otáček za minutu při teplotě 18-28 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 \pm 2 minut.



- Do všech jamek přidejte 100 μL zastavovacího roztoku. Odstraňte vzduchové bubliny špičkou pipety. Do 30 minut přejděte ke kroku 13.
- Odečtěte absorbanci při 450 nm ve čtečce mikrotitračních destiček.



KONTROLA KVALITY

Důkladné seznámení s tímto návodem k použití je nezbytné pro úspěšné používání výrobku. Spolehlivých výsledků lze dosáhnout pouze za použití přesných laboratorních technik a přesného dodržování tohoto návodu k použití.

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA se dodává se třemi kontrolami: negativní, nízká a střední. Kontroly mají přiřazené rozsahy hodnot (% Poměr) uvedené na listu s údaji o kontrole kvality dodávaném s každou soupravou. Pro získání platných výsledků musí být kontrolní měření v uvedeném rozmezí hodnot.

Kromě kontrolních souprav doporučujeme pro interní kontrolu kvality používat sérum.

Pro kalibrátor se doporučuje minimální hodnota OD_{450nm} 1,2. Výkonnostní charakteristiky by měly být ve stanovených mezích. Pokud provedení testu nesplňuje stanovené meze a opakování vyloučilo chyby v technice, zkontrolujte následující problémy: i) kontrola teploty (čididla použitá v kroku 3-9 udržovaná při 2-8 °C); ii) přesnost teploměřů, pipetovacích a časovacích zařízení; iii) nastavení čtečky ELISA; iv) datum spotřeby činidel; v) podmínky skladování a inkubace; vi) barva roztoku substrátu TMB (měl by být bezbarvý); vii) čistota vody; viii) metody odsávání a promývání.

STANDARDIZACE A METROLOGICKÁ NÁVAZNOST

Neexistují žádné mezinárodně nebo národně uznávané referenční materiály nebo referenční postupy měření protilátek proti gangliosidu nebo -MAG ve vzorcích séra. BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA je standardizována podle interně stanoveného referenčního materiálu. Hodnoty kalibrátoru jsou přiřazeny podle protokolu o přenosu hodnot (ref. 2), aby byla zaručena metrologická návaznost, a jsou uvedeny v arbitrárních jednotkách % poměru".

Byl stanoven 95 % interval spolehlivosti kombinované nejistoty kalibrátorů produktů na 29,3 % pro protilátky IgG a 37,6 % pro protilátky IgM.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ TESTŮ

- Zaznamenejte absorbanci (OD) při 450 nm pro každou jamku (kalibrátor, kontroly a vzorky).
- Pokud bylo provedeno více kalibračních a kontrolních měření, zprůměrujte hodnoty.

Výsledky jsou vyjádřeny jako poměr absorbance vzorků a (zprůměrované) absorbance kalibrátoru.

Směs izotypů

$$\% \text{ Poměr} = \frac{\text{absorbance vzorků nebo kontrol}}{\text{absorbance kalibrátoru}} \times 200$$

IgG a IgM izotypy

$$\% \text{ Poměr} = \frac{\text{absorbance vzorků nebo kontrol}}{\text{absorbance kalibrátoru}} \times 100$$

Programy pro výpočet výsledků jako % poměru jsou k dispozici na většině čteček mikrotitračních destiček.

Poznámka: Výsledky uvedené v tabulkách 7 a 8 jsou příklady a slouží pouze jako ukázka.

OMEZENÍ

- Vysoké výsledky % poměru (> 100 %) pro jednotlivé gangliosidy mohou mít za následek zkříženou reaktivitu s jinými gangliosidy v rámci téhož vzorku. Křížová reaktivita bude obvykle vykazovat vysokou variabilitu mezi jednotlivými testy. Interpretace výsledků by proto měla být prováděna pouze společně s odborníkem/specialistou.
- Vzhledem k polyreaktivitě autoimunitních protilátek a rozdílům v geografické prevalenci by výsledky testů měly být použity pouze jako podpora klinické interpretace neuropatie odborníkem/specialistou v kombinaci s klinickým obrazem pacienta (ref. 3).
- Tento test nebyl validován pro plazmaferézu.
- Intravenózní imunoglobuliny (IVIg) mohou ovlivnit výsledky testu.

REFERENČNÍ INTERVALY A MEZNÍ HODNOTY

Referenční interval BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA byl stanoven podle CLSI C28-A3 se 120 vzorky séra od subjektivně zdravých osob. Frekvence distribuce anti-gangliosidových a anti-MAG- protilátek u zdravých dárců krve byla klasifikována do kategorií titrů: negativní (poměr < 30 %), šedá zóna (poměr 30-50 %) a pozitivní (poměr > 50 %). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 9. Hraniční hodnota pro pozitivitu je 50 %.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

| Antigen | IgG/IgM směs | | |
|---------|---------------------|------------------------------------|-------------------|
| | Hodnoty (poměr v %) | | |
| | < 30 | 30-50 | > 50 |
| HNK-1 | Negativní | Viz poznámka */** | Viz poznámka */** |
| GM1 | | | |
| GT1a | | | |
| GD1a | | | |
| GD1b | | | |
| GQ1b | | | |
| | | Opakovaný test v pozdějším termínu | Pozitivní |

Tabulka 3

| Antigen | IgG | | |
|---------|---------------------|------------------------------------|---------------|
| | Hodnoty (poměr v %) | | |
| | < 30 | 30-50 | > 50 |
| HNK-1 | Negativní | Viz poznámka * | Viz poznámka* |
| GM1 | | | |
| GT1a | | | |
| GD1a | | | |
| GD1b | | | |
| GQ1b | | | |
| | | Opakovaný test v pozdějším termínu | Pozitivní |

Tabulka 4

| Antigen | IgM | | |
|---------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| | Hodnoty (poměr v %) | | |
| | < 30 | 30-50 | > 50 |
| HNK-1 | Negativní | Viz poznámka ** | Pozitivní (viz poznámka **) |
| GM1 | | Opakovaný test v pozdějším termínu | Pozitivní |
| GT1a | | | |
| GD1a | | | |
| GD1b | | | |
| GQ1b | | | |

Tabulka 5

Výsledky testů by měly být interpretovány ve spojení s informacemi dostupnými z klinického hodnocení pacienta a dalších diagnostických postupů.

* MAG neuropatie je běžně spojena s přítomností anti-MAG protilátek izotypu IgM (ref. 4).

** Výsledky mezi 30 % a 50 % (šedá zóna) nebo > 50 % (pozitivní) pro HNK-1 získané pomocí směsi nebo enzymového značení IgM mohou být znovu testovány pomocí anti-MAG Antibodies ELISA (EK-MAG).

VÝKONNOSTNÍ CHARAKTERISTIKY

Metoda srovnání

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA vs anti-MAG Antibodies ELISA

Srovnávací studie metod byla provedena podle pokynů CLSI EP09-A3 a EP12-A2. Sto dvacet dva (122) vzorků bylo měřeno pomocí 2 šarží testů BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA a 2 šarží anti-MAG Antibodies ELISA. Byla stanovena diagnostická shoda (kappa), negativní procentuální shoda a pozitivní procentuální shoda. Shody jsou uvedeny v tabulce 10.

Přesnost v rámci laboratoře

Pro antigangliosidy: 5,7 – 13,2 % CV

Pro anti-MAG: 14,4 – 36,5 % CV

Přesnost v rámci laboratoře byla stanovena podle pokynu CLSI EP05-A3 za použití standardizovaného plánu studie 20 dní x 2 série x 2 opakování. Byly testovány tři (3) sdružené vzorky séra pacientů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 11.

Opakovatelnost

Pro antigangliosidy: 7,7 – 19,1 % CV

Pro anti-MAG: 23,5 – 33,2 % CV

Opakovatelnost byla stanovena podle pokynů CLSI EP05-A3 s použitím plánu studie 3 přístroje/skupina/operátor x 5 dní x 5 opakování. Testovány byly tři (3) sdružené vzorky séra pacientů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 12.

Ratio Mez blanku (LoB) ≤ Mez detekce (LoD): ≤ 30 % Poměr

LoB a LoD byly stanoveny podle pokynu CLSI EP17-A2 pomocí neparametrické analýzy. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 13.

Hook efekt

Nebylo pozorováno žádné omezení způsobené Hook efektem na rozsah měření.

Zkřížená reaktivita

U vzorků od pacientů s různými autoimunitními chorobami (tabulka 14) a od pacientů s jinými neurologickými poruchami nebyla pozorována žádná systematická zkřížená reaktivita (tabulka 15).

KLINICKÝ VÝKON

Klinický výkon byl hodnocen na základě souhrnné analýzy recenzované odborné literatury. Šest (6) studií se zabývalo klinickým výkonem BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA v diagnostice autoimunitních periferních neuropatií (ref. 5-10). Výsledky analýzy a podrobnosti studie jsou uvedeny v tabulce 6, resp. v tabulce 16.

| | |
|------------------------|---|
| N periferní neuropatie | 201 (102 dětských GBS, 14 CIDP, 44 GBS, 41 anti-MAG neuropatie) |
| N kontroly | 493 (104 DC, 254 NC, 135 HC) |
| Senzitivita (95 % CI) | 68,1 % (39,6 – 87,5 %) |
| Specifická (95 % CI) | 88,0 % (72,3 – 95,3 %) |
| ROC AUC | 0,85 |

Tabulka 6

GBS, Guillainův-Barrého syndrom; DC, kontrola bez neurologického onemocnění; NC, neurologická kontrola; HC, zdravá kontrola; CIDP, chronická zánětlivá demyelinizační polyneuropatie; CI, interval spolehlivosti; ROC AUC, plocha pod křivkou operační charakteristiky.

INTERFERUJÍCÍ LÁTKY

Citlivost testu na perorální a injekční léčiva a na endogenní látky byla hodnocena podle pokynů CLSI EP07-A3. Za interferenci byla považována odchylka ve výsledcích $\geq \pm 20$ % Poměr.

Nebyla zjištěna žádná interference s následujícími látkami až do uvedených koncentrací: intravenózní imunoglobulin (20 mg/mL), rituximab (3 mg/mL), kladribin (273 ng/mL), interferon alfa-2a (49,5 ng/mL), gabapentin (26,7 µg/mL), ibuprofen (0,22 mg/mL), chlorambucil (1,96 µg/mL), prednison (99 ng/mL), prednisolon (1,2 µg/mL), revmatoidní faktor (2340 IU/mL), hemoglobin (10 mg/mL), hemolýzát (10 mg/mL), triglyceridy (15 mg/mL), konjugovaný bilirubin (20 µg/mL), nekonjugovaný bilirubin (150 µg/mL).

TABULKY A OBRÁZKY

Nastavení mikrotitračních destiček: Označení směsi IgG/IgM

| | | IgG/IgM Mix | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| Calibrator & Controls | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | A |
| | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | B |
| HNK-1 | | | | | | | | | | | | | | | C |
| GM1 | | | | | | | | | | | | | | | D |
| GT1a | | | | | | | | | | | | | | | E |
| GD1a | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | F | | |
| GD1b | | | | | | | | | | | | | | | G |
| GQ1b | | | | | | | | | | | | | | | H |

12 sera IgG/ IgM Mix

Obrázek 1A: ≤ 24 sér/sada (2 MP/sada)

Nastavení mikrotitračních destiček: Značení IgG a IgM

| | | IgG | | | | | | IgM | | | | | | | |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| Calibrator & Controls | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | CAL | CTRL Low | A |
| | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | CTRL Med | CTRL Neg | B |
| HNK-1 | | | | | | | | | | | | | | | C |
| GM1 | | | | | | | | | | | | | | | D |
| GT1a | | | | | | | | | | | | | | | E |
| GD1a | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | F | | |
| GD1b | | | | | | | | | | | | | | | G |
| GQ1b | | | | | | | | | | | | | | | H |

6 sera IgG 6 sera IgM

Obrázek 1B: 2 profily/sérum, ≤ 12 sér/sada (2 MP/sada)

Příklad výsledků

A Označení směsi IgG/IgM

| B-GCO-ELGM | Absorbance (OD450) | Poměr [%] |
|--------------------------|--------------------|-----------|
| Kalibrátor | 2,250 | |
| Kalibrátor prům. | 2,276 | 200 |
| Střední kontrola | 1,834 | |
| Střední kontrola prům. | 1,880 | 164 |
| Nízká kontrola | 0,513 | |
| Nízká kontrola prům. | 0,510 | 45 |
| Negativní kontrola | 0,040 | |
| Negativní kontrola prům. | 0,041 | 4 |
| Vzorek 1 HNK-1 | 0,299 | 26 |
| Vzorek 1 GM1 | 0,264 | 23 |
| Vzorek 1 GT1a | 0,500 | 44 |
| Vzorek 1 GD1a | 0,200 | 18 |
| Vzorek 1 GD1b | 1,018 | 90 |
| Vzorek 1 GQ1b | 0,228 | 20 |

Tabulka 7

B Označení IgG & IgM

| Označení enzymu | Absorbance (OD450) | | Poměr [%] | |
|--------------------------|--------------------|-------|-----------|-----|
| | IgG | IgM | IgG | IgM |
| B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM | | | | |
| Kalibrátor | 2,488 | 2,411 | | |
| Kalibrátor prům. | 2,446 | 2,201 | 100 | 100 |
| Střední kontrola | 1,879 | 1,734 | | |
| Střední kontrola prům. | 1,987 | 1,818 | 78 | 77 |
| Nízká kontrola | 0,452 | 0,501 | | |
| Nízká kontrola prům. | 0,716 | 0,609 | 24 | 24 |
| Negativní kontrola | 0,045 | 0,048 | | |
| Negativní kontrola prům. | 0,037 | 0,042 | 2 | 2 |
| Vzorek 1 HNK-1 | 0,423 | 0,621 | 17 | 27 |
| Vzorek 1 GM1 | 2,001 | 2,102 | 81 | 91 |
| Vzorek 1 GT1a | 0,521 | 0,237 | 21 | 10 |
| Vzorek 1 GD1a | 1,984 | 0,821 | 80 | 36 |
| Vzorek 1 GD1b | 0,473 | 1,923 | 19 | 83 |
| Vzorek 1 GQ1b | 0,094 | 0,911 | 4 | 40 |

Tabulka 8

TABULKY A OBRÁZKY

Referenční interval

| Analyt | % normální dárce krve v kategoriích | | | Referenční limit (90% CI) |
|----------------|-------------------------------------|--------------------|-----------------|---|
| | < 30 % poměr | 30 - 50 % poměr | > 50 % poměr | |
| 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 podskupina žen. M podskupina mužů

Tabulka 9

Porovnání metod anti-MAG protilátek

| Popis | N | Kappa shoda | | NPA | | PPA | |
|--------------------------------|-----|-------------|-------------|---------|------------------|---------|-----------------|
| | | Hodnota | 95 % CI | Hodnota | 95 % CI | Hodnota | 95 % CI |
| 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 směs vs. EK-MAG | 122 | 0,87 | 0,78 - 0,96 | 97,0 % | 89,5 % - 99,6 % | 89,3 % | 78,1 % - 96,0 % |

Tabulka 10

NPA: Negativní procentuální shoda

PPA: Pozitivní procentuální shoda

CI: Interval spolehlivosti

Přesnost v rámci laboratoře

| Popis příkladu | | | V rámci laboratoře Precision | | | |
|----------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|--------------|--------|
| Analyt | Enzymová značka (Izotyp) | Předpok. kategorie [% poměr] | N | Prům. [% poměr] | SD [% poměr] | 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 |

Tabulka 11

Opakovatelnost

| Vzorový popis | | | Opakovatelnost | | | |
|---------------|--------------------------|------------------------------|----------------|-----------------|--------------|--------|
| Analyt | Enzymová značka (Izotyp) | Předpok. kategorie [% poměr] | N | Prům. [% poměr] | SD [% poměr] | CV [%] |
| anti-GM1 Ab | IgM | 30-50 | 75 | 51 | 4,9 | 9,7 |
| | | > 50 | 75 | 94 | 7,2 | 7,7 |
| | IgG | 30-50 | 75 | 39 | 5,6 | 14,5 |
| | | > 50 | 75 | 106 | 17,1 | 16,1 |
| anti-GQ1b Ab | IgM | 30-50 | 75 | 48 | 3,9 | 8,2 |
| | | > 50 | 75 | 92 | 9,9 | 10,7 |
| | IgG | 30-50 | 75 | 42 | 8,1 | 19,1 |
| | | > 50 | 75 | 78 | 12,0 | 15,4 |
| anti-MAG Ab | IgM | 30-50 | 75 | 43 | 14,3 | 33,2 |
| | | > 50 | 75 | 98 | 23,1 | 23,5 |
| | IgGM | 30-50 | 75 | 42 | 10,6 | 25,0 |
| | | > 50 | 75 | 97 | 27,2 | 28,0 |

Tabulka 12

LoD a LoB

| Analyte | LoB [% poměr] | LoD [% poměr] |
|-------------------------|---------------|---------------|
| 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 |

Tabulka 13

Zkřížená reaktivita

| Přirazená protilátka | Diagnostika | # |
|---|-----------------------------------|----|
| Anti-neutrofilní cytoplazmatická protilátka (ANCA) | Vaskulitida | 3 |
| | Ostatní (ANCA pozitivní vzorky) | 10 |
| Antijaderné protilátky (ANA) | Systémový lupus erythematosus | 5 |
| | Revmatoidní artritida | 9 |
| | Sjögrenův syndrom | 6 |
| | Ostatní (ANA poz. vzorky) | 3 |
| Protilátky proti tyreoglobulinu (anti-Tg) | Autoimunitní tyreoiditida | 5 |
| Protilátky proti ribonukleoproteinům | Smišené onemocnění pojivové tkáně | 1 |
| Anti-GQ1b, anti-GM1, anti-GD1b | Autoimunitní periferní neuropatie | 1 |
| Protilátky proti acetylcholinovému receptoru a proti svalově specifické tyrozinkináze | Myasthenia gravis | 7 |

Tabulka 14

| Periferní neuropatie | # |
|--|----|
| Alkoholické | 1 |
| Diabetické | 5 |
| Periferní neuropatie imitující poruchy | # |
| Amyotrofická laterální skleróza (ALS) | 15 |
| Sarkodióza | 4 |
| Waldenströmova makroglobulinemie (WM) | 4 |
| Chagasova choroba | 5 |

Tabulka 15

TABULKY A OBRÁZKY

Klinický výkon

| Studie | Pozitivní kontroly (Případy) | Negativní kontroly | Epitopy | Sensitivita | Specifita |
|------------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------|-------------|-----------|
| Hashemilar et al., 2014 | Pediatická GBS (n = 45) | DC (n = 35) | GM1 | 0,51 | 0,89 |
| | | | GQ1b | 0,56 | 0,74 |
| Sharma et al., 2011 | Pediatická 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-neuropatie (n = 41) | NC (n = 112) HC (n = 6) | HNK-1 (MAG) | 0,98 | 0,99 |

Tabulka 16

GBS, Guillainův-Barrého syndrom; DC, kontrola bez neurologického onemocnění; NC, neurologická kontrola; HC, zdravá kontrola; MFS, Millerův Fisherův syndrom; CIDP, chronická zánětlivá demyelinizační polyneuropatie.

KRÁTKÝ PROTOKOL

Pozor: Krátký protokol není náhradou za podrobné informace popsané v tomto návodu.

Před dnem testování

Příprava promývacího pufru

Koncentrát promývacího pufru
nařed'te 1:10 deionizovanou vodou

*Doporučení: Promývací pufr si
připravte den před testem a
uložte jej na noc do chladničky.*

Den testování

Příprava vzorků/kontrol/kalibrátorů

Zřed'te vzorky séra v poměru 1:50
(studeným!) inkubačním pufrům a
důkladně promíchejte na třepačce

Rekonstituujte kontroly a
kalibrátor

nechte 30 minut při teplotě 2-8 °C

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA

Předem potažená mikrotitrační destička

*promyjte 2 x s $\geq 300 \mu\text{L}$ (studeného!) promývacího
roztoku*

100 μL kalibrátoru, kontrol nebo
vzorků séra (1:50)

*inkubujte 2 hodiny (± 5 minut) při teplotě 2-8 °C
promyjte 3 x s $\geq 300 \mu\text{L}$ (studeného!) promývacího
roztoku*

přidejte 100 μL enzymové značky

*inkubujte 2 hodiny (± 5 minut) při teplotě 2-8 °C
promyjte 3 x s $\geq 300 \mu\text{L}$ (studeného!) promývacího
roztoku*

přidejte 100 μL TMB substrátu (pokojová teplota)!

*inkubujte 30 minut (± 2 minuty) při teplotě 18-28 °C
na třepačce ~400-600 otáček za minutu*

přidejte 100 μL zastavovacího roztoku (pokojová teplota)!

➔ Odečtení absorbance při 450 nm (do 30 minut)

DOBA DO ZÍSKÁNÍ VÝSLEDKU: 5 HODIN

REFERENCE

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., Schlupe, 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).

ZMĚNY

| Datum | Verze | Změna |
|------------|-------|--|
| 2026-05-04 | A3 | Zpřesnění určeného použití doplněním informací o automatizaci testování, testované populaci a zamýšleném uživateli. Aktualizace kapitol <i>Odběr a skladování vzorků</i> a <i>Krátký protokol</i> . Aktualizace symbolu eIFU na titulní stránce a souvisejících informací v kapitole <i>Symboly</i> (platí pouze pro anglickou verzi dokumentu). |

HLÁŠENÍ INCIDENTŮ V ČLENSKÝCH STÁTECH EU

Pokud se v souvislosti s tímto prostředkem vyskytne jakákoli závažná událost, neprodleně ji nahláste výrobci a příslušnému orgánu vašeho členského státu.

POŠKOZENÍ ZÁSILKY

Pokud jste tento výrobek obdrželi poškozený, oznamte to prosím svému distributorovi.

SYMBOLY

BÜHLMANN používá symboly a značky uvedené a popsané v normě ISO 15223-1.

Definice symbolů naleznete ve slovníku symbolů na adrese: www.buhlmannlabs.ch/support/downloads/

Kromě toho se používají následující symboly a značky:

| Symbol | Vysvětlení |
|--------------|--------------------------------------|
| MP | Mikrotitrační destička |
| BUF WASH 10X | Konzentrát promývacího roztoku (10x) |
| BUF INC | Inkubační roztok |
| CAL | Kalibrátor |
| CONTROL - | Kontrola negativní |
| CONTROL L | Kontrola nízká |
| CONTROL M | Kontrola střední |
| EL IgG | Enzymová značka IgG |
| EL IgM | Enzymová značka IgM |
| EL MIX | Směs IgG/IgM označená enzymem |
| SUBS TMB | Substrát TMB |
| SOLN STOP | Zastavovací roztok |

