



BÜHLMANN GanglioCombi[®] MAG ELISA

ze znakowanymi enzymami IgG/IgM Mix, IgG i IgM

Wykrywanie przeciwciał anti-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: 2026-05-04
Wersja A3

 **Producent**

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

PRZEZNACZENIE

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA to oznaczenie do diagnostyki *in vitro* służące do ilościowego oznaczania przeciwciał IgG i/lub IgM przeciwko wybranym antygenom/epitopom nerwowym w próbkach surowicy pacjentów z podejrzeniem lub rozpoznaniem autoimmunologicznych neuropatii obwodowych. Wyniki testu mogą być wykorzystane do potwierdzenia rozpoznania autoimmunologicznych neuropatii obwodowych w połączeniu z innymi wynikami badań klinicznych i laboratoryjnych.

Wyłącznie do zastosowań laboratoryjnych przez pracowników służby zdrowia. Nie automatyczny.

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 gangliozydowi i glikoproteinie związanej z mieliną (MAG) w surowicy. Płytkę 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). Absorbencję 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
Płytkę do mikromiareczkowania 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) z środkami konserwującymi	2 butelki x 100 mL	B-GCO-WB	Rozcieńczyć z 900 mL wody dejonizowanej
Bufor inkubacyjny z środkami konserwującymi	1 butelka x 100 mL	B-GCO-IB	Gotowy do użycia
Kalibrator zliofilizowane ze środkami konserwującymi	1 fiolka	B-GCO-CA	Dodać 1,5 mL buforu inkubacyjnego
Kontrola Negatywna, Niska i Średnia ¹ zliofilizowane ze środkami konserwującymi	3 fiolki	B-GCO-CONSET	Dodać 1,5 mL buforu inkubacyjnego
Mieszanina IgG/IgM znakowana enzymem anty-ludzkie przeciwciała IgG i IgM skoniugowane z HRP w matrycy buforowej ze środkami konserwującymi	2 fiolki x 11 mL	B-GCO-ELGM	Gotowy do użycia
Znakowane enzymem IgG anty-ludzkie przeciwciała IgG skoniugowane z HRP w matrycy buforowej ze środkami konserwującymi	1 fiolka x 11 mL	B-GCO-ELG	Gotowy do użycia
Znakowane enzymem IgM anty-ludzkie przeciwciała IgM skoniugowane z HRP w matrycy buforowej ze środkami konserwującymi	1 fiolka x 11 mL	B-GCO-ELM	Gotowy do użycia
Substrat TMB TMB w buforze cytrynianowym	2 fiolki x 11 mL	B-TMB	Gotowy do użycia
Roztwór zatrzymujący reakcję 0,25 M kwas siarkowy	2 fiolki x 11 mL	B-STTS	Gotowy do użycia 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/ rekonstruowane odczynniki	
Płytkę do mikromiareczkowania	Niezużyte stripy natychmiast włożyć z powrotem do torebki foliowej zawierającej saszetki ze środkiem osuszającym i ponownie szczelnie zamknąć wzdłuż całej krawędzi torebki. 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

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE

- 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. Choć 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 chlorowodrek 2-metylo-4-izotiazolin-3-onu (stęż. $\geq 0,0015$ %), w związku z tym, odczynniki mogą powodować reakcje alergiczne skóry (H317).
 - Bufor inkubacyjny i bufor płuczający 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 płuczający 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 dążyć do wszelkich starań, aby nie doszło do zanieczyszczenia krzyżowego między odczynnikami, próbkami lub między studzienkami.
- Mikrostudzienki nie mogą być użyte ponownie.

POBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

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. Próbkę surowicy można przechowywać do ośmiu tygodni w temperaturze 2–8 °C, do tygodnia w temperaturze 28 °C oraz do 25 miesięcy w temperaturze ≤ -20 °C. 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/rozmarzania.

PROCEDURA WYKONANIA TESTU

Istnieją dwie opcje:

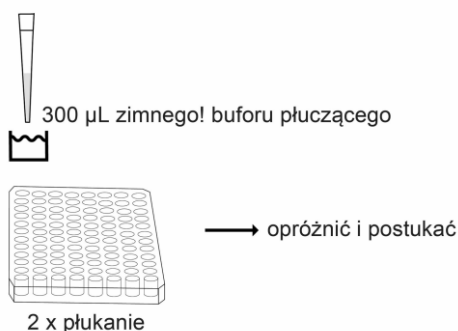
- (1) Detekcja mieszanych izotypów (IgG i IgM): dodać mieszaninę enzymatycznych znaczników w punkcie 7
- (2) Detekcja izotypów IgG lub IgM: dodać znakowany enzymem IgG lub znakowany enzymem IgM w punkcie 7

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 $^{\circ}\text{C}$) buforu inkubacyjnego. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie i pozostawić rozcieńczone próbki, jak również rekonstruowany kalibrator i kontrole w temperaturze 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$) 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).

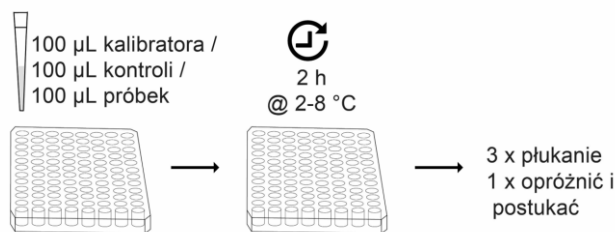
Uwaga dla opcji 1: Jeżeli używanych jest więcej niż trzy paski na serię, kalibrator i kontrole mogą być testowane w duplikatach (odnieść się do ryciny 1A).

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 $^{\circ}\text{C}$ (nie wstrząsać płytki).
6. Zdjąć folię z płytki. Opróżnić studzienki i przepłukać trzy razy przy użyciu co najmniej 300 μL zimnego! (2-8 $^{\circ}\text{C}$) buforu płuczącego na studzienkę. Opróżnić studzienki i mocno stuknąć płytką o bibułę w celu całkowitego pozbycia się buforu płuczącego.

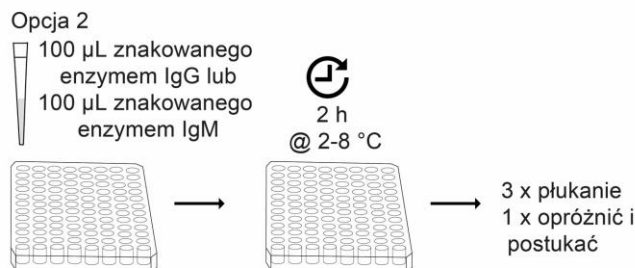
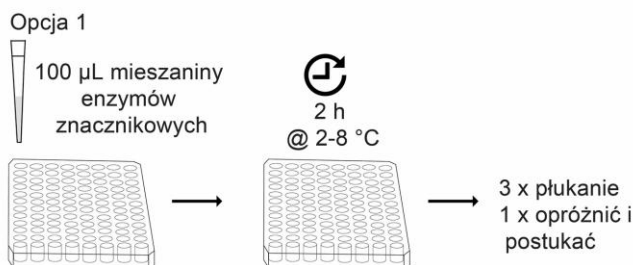


Dla opcji 1: Detekcja mieszaniny izotypów

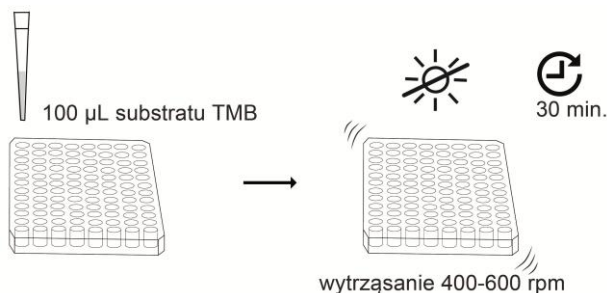
7. Dodać 100 μL mieszaniny do studzienek.

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 $^{\circ}\text{C}$ (nie wstrząsać płytki).
9. Zdjąć folię z płytki. Opróżnić studzienki i przepłukać trzy razy przy użyciu co najmniej 300 μL zimnego! (2-8 $^{\circ}\text{C}$) buforu płuczącego na studzienkę. Opróżnić studzienki i postukać mocno płytką w bibułę.

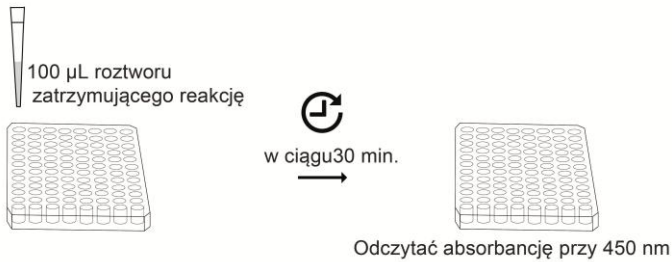


10. Dodać 100 μL roztworu substratu TMB (zrównoważonego do temperatury pokojowej) do każdej studzienki.
11. Przykryć płytkę folią do płytek, chronić płytkę przed światłem i inkubować na wstrząsarce do płytek przy 400-600 rpm, w temperaturze 18-28 $^{\circ}\text{C}$ przez 30 ± 2 minuty.



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. 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. Pomiar kontrolny musi 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 wewnątrznie 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

- Odczytać absorbancję (OD) przy 450 nm dla każdej studzienki (kalibrator, kontrole i próbki).
- 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 mikroplatek.

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	Odniesić się do adnotacji *	Odniesić 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	Odniesić 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 anti-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 anti-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 $\geq \pm 20$ % stosunku uznano za interferencję.

Nie wykryto interferencji z następującymi substancjami do podanych stężeń: immunoglobulina dożylna (20 mg/mL), rytuksymab (3 mg/mL), kładrybina (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

		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

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

Konfiguracja płytki do mikromiareczkowania: znakowane IgG & 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

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

Przykład wyników

A Znakowana mieszanina IgG/IgM

B-GCO-ELGM	Absorbancja (OD450)	Stosunek [%]
Kalibrator	2,250 2,276	
Średnia wartość kalibratora	2,263	200
Średnia kontrola	1,834 1,880	
Średnia wartość średniej kontroli	1,857	164
Niska kontrola	0,513 0,510	
Średnia wartość niskiej kontroli	0,512	45
Negatywna kontrola	0,040 0,041	
Średnia wartość negatywnej kontroli	0,041	4
Próbka 1 HNK-1	0,299	26
Próbka 1 GM1	0,264	23
Próbka 1 GT1a	0,500	44
Próbka 1 GD1a	0,200	18
Próbka 1 GD1b	1,018	90
Próbka 1 GQ1b	0,228	20

Tabela 7

B Znakowane IgG & IgM

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

Tabela 8

TABELE I RYCINY

Przedziały referencyjne

Analit	% zwykłych krwiodawców w kategoriach			Limit referencyjny (90 % CI)
	< 30 % stosunek	30-50 % stosunek	> 50 % stosunek	
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 podgrupa kobiet. M podgrupa mężczyzn

Tabela 9

Porównanie z metodą przeciwciała anty-MAG

Opis	N	Zgodność Kappa		NPA		PPA	
		Wart-ość	95 % CI	Wart-ość	95 % CI	Wart-ość	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 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

Analit	Opis próbek		Precyzja wewnątrzlaboratoryjna y			
	Enzym- atyczny 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
anty-GM1 Ab	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
anty-GQ1b Ab	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
anty-MAG Ab	IgGM	30-50	80	27	9,6	35,3
		> 50	80	51	18,8	36,5

Tabela 11

Odtwarzalność

Opis próbek			Odtwarzalność			
Analit	Enzym- atyczny 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
anty-GM1 Ab	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
anty-GQ1b Ab	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
anty-MAG Ab	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 przeciwciała	Diagnostyka	#
Przeciwciała 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 acetylocholino i kinaza tyrozynowa specyficzna dla mięśni	Miastenia gravis (Miastenia rzekomoporaźna dla mięśni)	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 (Przykłady)	Kontrole negatywne	Epitop	Czułość	Specyficzność
Hashemilar et al., 2014	Pediatria 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) 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

KRÓTKI PROTOKÓŁ

Ważne: Krótki protokół nie zastępuje szczegółowych informacji zawartych w niniejszej instrukcji użytkownika.

Dzień przed wykonaniem testu

Przygotowanie buforu płuczącego

Rozcieńczyć koncentrat buforu płuczącego wodą dejonizowaną w stosunku 1:10

Zalecenie: Przygotować bufor płuczący dzień przed wykonaniem testu i zostawić na noc w lodówce.

Dzień wykonania testu

Przygotowanie próbek/kontroli/kalibratorów

Rozcieńczyć próbki surowicy 1:50 (zimnym!) buforem inkubacyjnym i dokładnie wymieszać przez worteksowanie

Odtworzyć kontrole i kalibrator

pozostawić na 30 minut w temperaturze 2-8 °C

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA

Wstępnie powlekana płytka do mikromiareczkowania

przepłukać 2 x przy użyciu $\geq 300 \mu\text{L}$ (zimnego!) buforu płuczącego

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

inkubować 2 godziny ($\pm 5 \text{ min}$) w 2-8 °C
przepłukać 3 x przy użyciu $\geq 300 \mu\text{L}$ (zimnego!) buforu płuczącego

dodać 100 μL enzymatycznych znaczników

inkubować 2 godziny ($\pm 5 \text{ min}$) w 2-8 °C
przepłukać 3 x przy użyciu $\geq 300 \mu\text{L}$ (zimnego!) buforu płuczącego

dodać 100 μL substratu TMB (temperatura otoczenia)!

inkubować 30 min ($\pm 2 \text{ min}$) w 18-28 °C na wstrząsarce do płytek przy $\sim 400\text{-}600 \text{ rpm}$

dodać 100 μL roztworu zatrzymującego reakcję (temperatura otoczenia)!

➔ Odczytać absorbancję przy 450 nm (w ciągu 30 minut)

CZAS DO OTRZYMANIA WYNIKÓW: 5 GODZIN

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., 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).

LISTA ZMIAN

Data	Wersja	Zmiana
2026-05-04	A3	Sprecyzowanie rozdziału <i>Przeznaczenie</i> przez dodanie informacji dotyczących automatyzacji testu, badanej populacji oraz użytkownika docelowego. Aktualizacja rozdziałów <i>Pobieranie i przechowywanie próbek</i> oraz <i>Krótki protokół</i> . Aktualizacja symbolu eIFU na pierwszej stronie oraz powiązanych informacji w rozdziale <i>Symbol</i> (dotyczy tylko wersji dokumentu w języku angielskim).

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.

Definicje symboli można znaleźć w słowniczku symboli na stronie: www.buhmannlabs.ch/support/downloads/

Dodatkowo stosowane są następujące symbole i oznaczenia:

Symbol	Wyjaśnienie
MP	Płytko do mikromiarczkowania
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

