# Anti-GM1 Antibodies ELISA

## με σημασμένα ένζυμα IgG και IgM

## Ανίχνευση αντισωμάτων αντι-γαγγλιοσιδίου M1 με ELISA

(GM1)

Για *In Vitro* Διαγνωστική Χρήση

EK-GM1-GM 96 τεστ

Ημερομηνία Κυκλοφορίας: 2023-08-17
Έκδοση A2

**Κατασκευαστής**
**BÜHLMANN Laboratories AG**
Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Ελβετία
Τηλέφωνο.: +41 61 487 12 12
Φαξ: +41 61 487 12 34
info@buhlmannlabs.ch

# ΕΛΛΗΝΙΚΑ

## ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το anti-GM1 Antibodies ELISA είναι μια *in vitro* διαγνωστική δοκιμασία για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των IgG ή/και IgM αντισωμάτων έναντι του νευρικού αντιγόνου/επιτόπου GM1 σε δείγματα ορού. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την υποστήριξη της διάγνωσης αυτοάνοσων περιφερικών νευροπαθειών σε συνδυασμό με άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα.
Για εργαστηριακή χρήση.

## ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Το anti-GM1 Antibodies ELISA επιτρέπει τη μέτρηση των αντισωμάτων έναντι του GM1 (ganglioside M1) στον ορό. Η πλάκα μικροτιτλοδότησης είναι επικαλυμμένη με γαγγλιοσίδια: GM1.
Οι οροί των ασθενών, οι μάρτυρες αι ο βαθμονομητής προστίθενται στα βοθρία της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Μετά από 2 ώρες επώασης στους 2 - 8°C και στάδια πλύσης, τα αντισώματα ανίχνευσης (αντι-IgG, αντι-IgM) συζευγμένα με υπεροξειδάση χρένου (HRP) ανιχνεύουν τα αντισώματα anti-GM1 που συνδέονται με το ακινητοποιημένο GM1 γαγγλιοσίδιο στην πλάκα. Μετά από άλλες 2 ώρες επώασης και περαιτέρω βήματα πλύσης, προστίθεται το χρωμογόνο υπόστρωμα HRP, τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB) (σχηματισμός μπλε χρώματος) και ακολουθεί διακοπή της αντίδρασης (αλλαγή σε κίτρινο χρώμα). Η απορρόφηση μετράται στα 450 nm.
Η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη του τίτλου των αντισωμάτων anti-GM1 που υπάρχουν σε ένα δεδομένο δείγμα. Οι τίτλοι αντισωμάτων εκφράζονται ως % αναλογίες του βαθμονομητή και μπορούν να αντιστοιχιστούν σε κατηγορίες τίτλων (αρνητική, γκρίζα ζώνη, θετική).

## ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα | Κωδικός | Ανασύσταση |
|---|---|---|---|
| **Πλάκα μικροτιτλοδότησης** προεπικαλυμμένη με GM1 | 12 x 8 λωρίδες βοθρίων με πλαίσιο | B-GM1-MP | Έτοιμο για χρήση |
| **Κάλυμμα πλάκας** | 3 τεμάχια | | |
| **Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (10x)** με συντηρητικά | 1 μπουκάλια x 100 mL | B-GCO-WB | Αραιώστε με 900 mL απιονισμένου νερού |
| **Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης** με συντηρητικά | 1 μπουκάλι x 100 mL | B-GCO-IB | Έτοιμο για χρήση |
| **Βαθμονομητής** λυοφιλοποιημένο με συντηρητικά | 1 φιαλίδιο | B-GCO-CA | Προσθέστε 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος επώασης |
| **Μάρτυρας Αρνητικός, Χαμηλός και Μεσαίος**[1] λυοφιλοποιημένο με συντηρητικά | 3 φιαλίδια | B-GCO-CONSET | Προσθέστε 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος επώασης |
| **Σημασμένο ένζυμο IgG** αντίσωμα αντι-ανθρώπινου IgG συζευγμένο με HRP σε ρυθμιστικό πλέγμα με συντηρητικά | 1 φιαλίδιο x 11 mL | B-GCO-ELG | Έτοιμο για χρήση |
| **Σημασμένο ένζυμο IgM** αντίσωμα αντι-ανθρώπινου IgM συζευγμένο με HRP σε ρυθμιστικό πλέγμα με συντηρητικά | 1 φιαλίδιο x 11 mL | B-GCO-ELM | Έτοιμο για χρήση |
| **Υπόστρωμα TMB** TMB σε κιτρικό ρυθμιστικό | 1 φιαλίδιο x 11 mL | B-TMB | Έτοιμο για χρήση |
| **Ανασχετικό διάλυμα** 0,25 M θειικό οξύ | 1 φιαλίδιο x 11 mL | B-STS | Έτοιμο για χρήση **Διαβρωτικός παράγοντας** |

Πίνακας 1

[1]Οι μάρτυρες περιέχουν συγκεκριμένα επίπεδα αντισωμάτων anti-GM1. Ανατρέξτε στο πρόσθετο φύλλο δεδομένων QC για την πραγματική μέση OD και την αναλογία %.

## ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

| **Σφραγισμένα / κλειστά αντιδραστήρια** | |
|---|---|
| Φυλάσσεται στους 2-8 °C. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια πέρα από την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες. | |
| **Ανοιγμένα / ανασυσταμένα αντιδραστήρια** | |
| Μικρόπλακα | Επιστρέψτε τις αχρησιμοποίητες σειρές αμέσως στη θήκη από αλουμινόχαρτο που περιέχει τις συσκευασίες ξηραντικού και κλείστε ξανά κατά μήκος ολόκληρης της άκρης του φερμουάρ. Φυλάσσετε για έως και 6 μήνες στους 2-8 °C. |
| Αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης | Φυλάσσετε για έως και 6 μήνες στους 2-8 °C. |
| Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης | |
| Σημασμένο ένζυμο | |
| Υπόστρωμα TMB | |
| Βαθμονομητές | |
| Μάρτυρες | |
| Ανασχετικό διάλυμα | Φυλάσσετε για έως και 6 μήνες στους 18-28 °C. |

Πίνακας 2

## ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Πιπέτες ακριβείας με ρύγχη μιας χρήσης: Πιπέτες 10 μL, 20 μL, 100 μL και 1000 μL
- Σωληνάρια μιας χρήσης από πολυστυρένιο ή πολυπροπυλένιο για την παρασκευή αραιώσεων δειγμάτων
- 1000 mL κύλινδρος για την αραίωση του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης
- Πλυστικό μικρόπλακας
- απορροφητικό χαρτί
- Αναδευτής μικρόπλακας
- Φωτόμετρο πλάκα μικροτιτλοδότησης για μέτρηση απορρόφησης στα 450 nm

## ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

### Προφυλάξεις ασφαλείας

- Ο βαθμονομητής και οι μάρτυρες αυτού του κιτ περιέχουν συστατικά ανθρώπινης προέλευσης. Παρόλο που ελέγχθηκαν και βρέθηκαν αρνητικά για HBV, HCV και HIV1/2, τα αντιδραστήρια πρέπει να χειρίζονται σαν να είναι ικανά να μεταδώσουν λοιμώξεις και πρέπει να χειρίζονται σύμφωνα με τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές (GLP) χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες προφυλάξεις.
- Αυτό το κιτ περιέχει συστατικά ταξινομημένα σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) Αρ. 1272/2008:
  - Το ανασχετικό διάλυμα περιέχει θειικό οξύ (συγκ. 2,5–5%), επομένως τα αντιδραστήρια μπορεί να προκαλέσουν ερεθισμό του δέρματος (H315), σοβαρό ερεθισμό των ματιών (H319) και μπορεί να είναι διαβρωτικά για τα μέταλλα (H290).
  - Ο βαθμονομητής, οι μάρτυρες ελέγχου και τα σημασμένα ένζυμα περιέχουν υδροχλωρική 2-μεθυλ-4-ισοθειαζολιν-3-όνη (συγκέντρωση ≥ 0,0015%), επομένως τα αντιδραστήρια ενδέχεται να προκαλέσουν αλλεργικές δερματικές αντιδράσεις (H317).
  - Το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης και το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης περιέχουν θειική γενταμικίνη, επομένως τα αντιδραστήρια ενδέχεται να προκαλέσουν αλλεργική δερματική αντίδραση (H317).
- Αποφύγετε την επαφή των αντιδραστηρίων με το δέρμα, τα μάτια ή τους βλεννογόνους. Εάν συμβεί επαφή, πλύνετε αμέσως με γενναιόδωρη ποσότητα νερού. Διαφορετικά, μπορεί να προκληθεί ερεθισμός / εγκαύματα.
- Τα αντιδραστήρια και τα χημικά πρέπει να αντιμετωπίζονται ως επικίνδυνα απόβλητα σύμφωνα με τις εθνικές κατευθυντήριες γραμμές ή κανονισμούς για την ασφάλεια των βιολογικών κινδύνων.

### Τεχνικές προφυλάξεις

- Διαβάστε προσεκτικά τις οδηγίες πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής. Η απόδοση της δοκιμής θα επηρεαστεί αρνητικά, εάν τα αντιδραστήρια αραιωθούν, τροποποιηθούν ή φυλάσσονται λανθασμένα υπό συνθήκες διαφορετικές από αυτές που περιγράφονται στην παρούσα οδηγία χρήσης.

### Διαδικασία ELISA

#### Θερμοκρασία αντιδραστηρίων

- Προετοιμάστε τα αντιδραστήρια πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία ανάλυσης. Βήματα 3-9: Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στα βήματα 3-9 πρέπει να είναι κρύα (2-8 °C) και να διατηρούνται κρύα κατά τη μεταφορά με πιπέτα και το πλύσιμο. Σύσταση: Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης την ημέρα πριν από την εκτέλεση της ανάλυσης και βάλτε το στο ψυγείο όλη τη νύχτα.
- Εκτελέστε όλα τα βήματα πλύσης με κρύο (2-8 °C) ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης.
- Ρυθμίστε το υπόστρωμα TMB και το ανασχετικό διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου (18-28 °C) στην αρχή της διαδικασίας ανάλυσης.

#### Βήματα πλύσης

- Τα βήματα πλύσης 3, 6 και 9 είναι κρίσιμα για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων που προκύπτουν από τη διαδικασία παραγωγής ή/και των δυνητικά μη δεσμευμένων αντισωμάτων στα βοθρία.
- Συνιστάται ανεπιφύλακτα ένα αυτοματοποιημένο πλυστικό που λειτουργεί σε "λειτουργία πλάκας", δηλαδή κάθε στάδιο της διαδικασίας (διανομή / αναρρόφηση) πραγματοποιείται σε όλες τις σειρές, διαδοχικά, πριν το όργανο συνεχίσει με τον επόμενο κύκλο πλύσης.
- Βεβαιωθείτε ότι όλα τα βοθρία είναι εντελώς άδεια μετά τον τελευταίο κύκλο πλύσης.

#### Επώαση υποστρώματος

- Βήμα 11: Ανακινήστε τις πλάκα μικροτιτλοδότησης κατά την επώαση με υπόστρωμα. Ανάλογα με το μοντέλο του αναδευτήρα πλάκας προτείνουμε 400-600 rpm. Το διάλυμα πρέπει να κινείται στα βοθρία αλλά δεν πρέπει να χυθεί.

### Εξαρτήματα κιτ

- Τα εξαρτήματα δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.
- Μην αναμιγνύετε διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων.
- Θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ αντιδραστηρίων, δειγμάτων ή μεταξύ βοθρίων.
- Οι πλάκες δεν μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν.

## ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η διαδικασία απαιτεί <0,1 mL αίματος ή <50 μL ορού, αντίστοιχα.

Συλλέξτε αίμα σε απλούς σωλήνες φλεβοκέντησης χωρίς πρόσθετα και αποφύγετε την αιμόλυση. Εκτελέστε προετοιμασία ορού σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μεταγγίστε τον ορό.

Τα δείγματα ορού μπορούν να αποθηκευτούν στους 2-8 °C για έως και οκτώ εβδομάδες, στους 28 °C για έως και μία εβδομάδα και στους ≤-20 °C για 16 εβδομάδες. Τα κατεψυγμένα δείγματα πρέπει να αποψύχονται και να αναμειγνύονται επιμελώς με απαλό στροβιλισμό ή αναστροφή πριν από τη χρήση.
Συνιστούμε να προετοιμάζετε δείγματα ορού πριν από την κατάψυξη προκειμένου να αποφευχθούν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι κατάψυξης/απόψυξης.

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

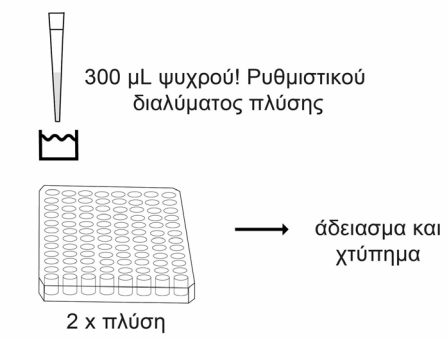
*Σημείωση: Φέρτε το διάλυμα υποστρώματος TMB σε θερμοκρασία δωματίου ( 18-28 °C ).*

1. Αραιώστε τα δείγματα 1:50 με ρυθμιστικό διάλυμα επώασης. Χρησιμοποιήστε π.χ. 10 μL ορού + 490 μL ψυχρού! (2-8 °C) ρυθμιστικό διάλυμα επώασης. Ανακατέψτε καλά με vortex και αφήστε τα αραιωμένα δείγματα καθώς και τον ανασυσταθέν βαθμονομητή και τους μάρτυρες σε θερμοκρασία 2-8 °C για 30 λεπτά πριν από τη προσθήκη βλ.
2. Προετοιμάστε ένα πλαίσιο πλάκας με επαρκείς σειρές για να δοκιμάσετε τον απαιτούμενο αριθμό βαθμονομητών, μαρτύρων και δειγμάτων. Αφαιρέστε τις περίσσιες λωρίδες από το πλαίσιο και ξανασφραγίστε το στη θήκη από

αλουμινόχαρτο μαζί με τις συσκευασίες ξηραντικού χωρίς καθυστέρηση. Αποθηκεύεται στο ψυγείο.

*Σημείωση: Χρησιμοποιήστε ψυχρά αντιδραστήρια στα βήματα 3 έως 9.*

3. Πλύνετε τα βοθρία δύο φορές χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 300 μL κρύου! (2-8 °C) ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης ανά βοθρίο. Αδειάστε τα βοθρία και χτυπήστε την πλάκα σταθερά πάνω σε απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε τελείως το υπόλοιπο υγρό.




*Σημείωση : Προχωρήστε αμέσως στα επόμενα βήματα.*

**Ανίχνευση του IgG-Ισότυπου:**

4a. Προσθέστε 100 μL βαθμονομητή στο βοθρίο A1 (βλ. σχήμα 1a).

4b. Προσθέστε 100 μL μεσαίου μάρτυρα στο βοθρίο B1, χαμηλού μάρτυρα στο βοθρίο C1 και αρνητικού μάρτυρα στο βοθρίο D1 (βλ. σχήμα 1a).

4c. Προσθέστε 100 μL αραιωμένου δείγματος 1 στο βοθρίο E1 (βλ. σχήμα 1a).

4d. Προσθέστε 100 μL αραιωμένου δείγματος 2 στο βοθρίο F1 (βλ. σχήμα 1a).

4e. Προσθέστε 100 μL αραιωμένων δειγμάτων x-y στα επόμενα βοθρία (βλ. σχήμα 1a).

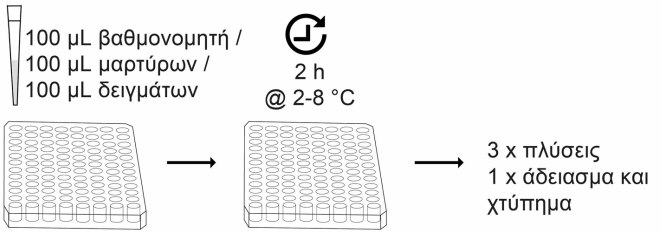
**Ανίχνευση του IgM- Ισότυπου**

4f. Επαναλάβετε το βήμα 4a-4e χρησιμοποιώντας τα επόμενα βοθρία.

*Σημείωση: Ο βαθμονομητής και οι μάρτυρες πρέπει να εκτελούνται χωριστά για τους ισοτύπους IgG και IgM. Συνιστούμε τη διενέργεια δοκιμών βαθμονομητή και μαρτύρων εις διπλούν εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από 3 λωρίδες ανά εκτέλεση. Βλέπε σχήμα 1b για εναλλακτικό τρόπο διοχέτευσης με πιπέτα.*

5. Σφραγίστε την πλάκα με κάλυμμα και επωάστε για 2 ώρες (±5 λεπτά) στους 2-8 °C (μην ανακινείτε την πλακα).

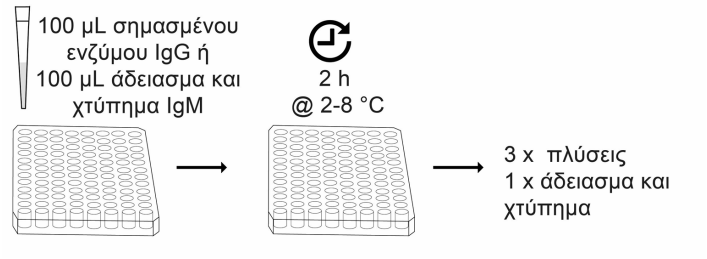
6. Αφαιρέστε το κάλυμμα της πλάκας. Αδειάστε τα βοθρία και πλύνετε τρεις φορές χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 300 μL κρύου! (2-8 °C) ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης ανά βοθρίο. Αδειάστε τα βοθρία και χτυπήστε την πλάκα σταθερά πάνω σε απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε τελείως το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης.




7. Προσθέστε 100 μL είτε του σημασμένου ενζύμου IgG ή IgM στα αντίστοιχα βοθρία (βλέπε σχήμα 1).

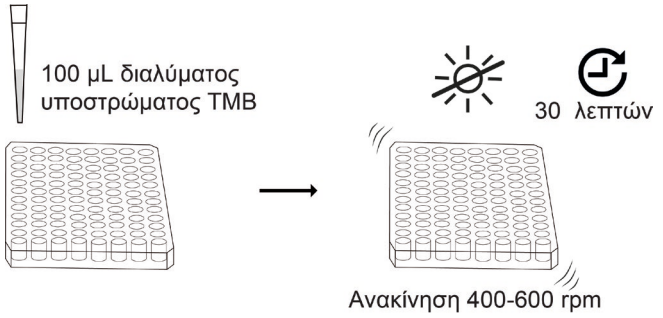
8. Σφραγίστε την πλάκα με κάλυμμα και επωάστε για 2 ώρες (±5 λεπτά) στους 2-8 °C (μην ανακινείτε την πλακα).

9. Αφαιρέστε το κάλυμμα της πλάκας. Αδειάστε τα βοθρία και κάντε πλύσεις τρεις φορές χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 300 μL κρύου! (2-8 °C) ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης ανά βοθρίο. Αδειάστε τα βοθρία και χτυπήστε την πλάκα σταθερά πάνω σε απορροφητικό χαρτί.



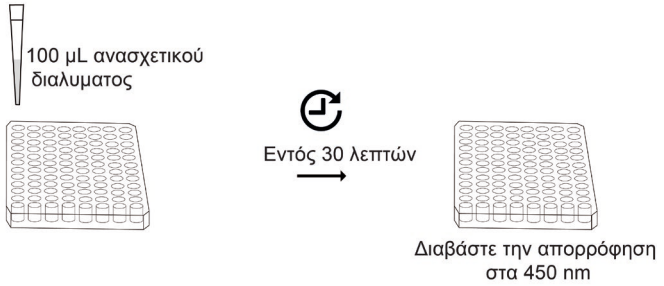

10. Προσθέστε 100 μL διαλύματος υποστρώματος TMB (εξισορροπημένο σε θερμοκρασία δωματίου) σε κάθε βοθρίο.

11. Σφραγίστε την πλάκα με κάλυμμα προστατέψτε την πλάκα από το φως και επωάστε σε αναδευτήρα πλάκας που έχει ρυθμιστεί στις 400-600 rpm, στους 18-28 °C για 30 ±2 λεπτά.




12. Προσθέστε 100 μL ανασχετικού διαλύματος σε όλα τα βοθρία. Αφαιρέστε τις φυσαλίδες αέρα με ένα ρύγχος πιπέτας. Προχωρήστε στο βήμα 13 μέσα σε 30 λεπτά.

13. Διαβάστε την απορρόφηση στα 450 nm σε συσκευή ανάγνωσης πλακών.




## ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Η πλήρης κατανόηση αυτών των οδηγιών χρήσης είναι απαραίτητη για την επιτυχή χρήση του προϊόντος. Αξιόπιστα αποτελέσματα θα ληφθούν μόνο με τη χρήση ακριβών εργαστηριακών τεχνικών και με ακρίβεια ακολουθώντας αυτήν την οδηγία χρήσης. Anti-GM1 Antibodies ELISA κιτ συνοδεύεται από τρεις μάρτυρες: αρνητικό, χαμηλό και μεσαίο μάρτυρα. Οι μάρτυρες έχουν εκχωρήσει εύρη τιμών (%Αναλογία) που υποδεικνύονται στο φύλλο δεδομένων QC που παρέχεται με κάθε κιτ. Οι μάρτυρες πρέπει να βρίσκονται εντός των ενδεικνυόμενων τιμών για να ληφθούν

έγκυρα αποτελέσματα. Εκτός από τους μάρτυρες, συνιστούμε τη χρήση δεξαμενών ορού για εσωτερικό έλεγχο ποιότητας.
Μια ελάχιστη $OD_{450nm}$ τιμή του 1,2 είναι προτεινόμενη για τον βαθμονομητή.
Τα χαρακτηριστικά επιδόσεων πρέπει να είναι εντός των καθορισμένων ορίων. Εάν η απόδοση της ανάλυσης δεν πληροί τα καθορισμένα όρια και η επανάληψη έχει αποκλείσει σφάλματα στην τεχνική, ελέγξτε τα ακόλουθα ζητήματα: i) έλεγχος θερμοκρασίας (αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στο βήμα 3-9 διατηρούνται στους 2-8 °C) ii) ακρίβεια των θερμομέτρων, συσκευές πιπέτας και χρονισμού. iii) Ρυθμίσεις αναγνώστη ELISA. iv) ημερομηνίες λήξης των αντιδραστηρίων. v) συνθήκες αποθήκευσης και επώασης. vi) το χρώμα του διαλύματος υποστρώματος TMB (θα πρέπει να είναι άχρωμο). vii) καθαρότητα νερού. viii) μέθοδοι αναρρόφησης και πλύσης.

## ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΡΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ

Δεν υπάρχουν διεθνώς ή εθνικά αναγνωρισμένα υλικά αναφοράς ή διαδικασίες μέτρησης αναφοράς για το αντι-γαγγλιοσίδιο σε δείγματα ορού. Το anti-GM1 Antibodies ELISA είναι τυποποιημένο έναντι ενός εσωτερικά καθιερωμένου υλικού αναφοράς. Οι τιμές βαθμονομητή αποδίδονται σύμφωνα με ένα πρωτόκολλο μεταφοράς τιμών (βλ. 1), ώστε να διασφαλίζεται η μετρολογική ιχνηλασιμότητα, και αναγράφονται σε αυθαίρετες μονάδες "%Αναλογία".
Το 95% διάστημα εμπιστοσύνης της συνδυασμένης αβεβαιότητας των βαθμονομητών του προϊόντος προσδιορίστηκε σε 29,3% για τα αντισώματα IgG και 37,6% για τα αντισώματα IgM.

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ

1. Καταγράψτε την απορρόφηση (OD) στα 450 nm για κάθε βοθρίο (βαθμονομητής, μάρτυρες και δείγματα).
2. Εάν πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές μετρήσεις βαθμονομητή και μάρτυρα, υπολογίστε τον μέσο όρο των τιμών.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγος της απορρόφησης των δειγμάτων και της (μέσης) απορρόφησης του βαθμονομητή.

$$\%\ \text{Αναλογία:}\ \frac{\text{απορρόφηση δειγμάτων ή μαρτύρων}}{\text{απορρόφηση του βαθμονομητή}} \times 100$$

Προγράμματα για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων ως ποσοστό % είναι διαθέσιμα στις περισσότερες συσκευές ανάγνωσης μικροπλακών.

*Σημείωση: Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες 5 είναι παραδείγματα και παρέχονται μόνο για σκοπούς επίδειξης.*

## ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Λόγω της πολυαντιδραστικότητας των αυτοάνοσων αντισωμάτων και των διαφορών στη γεωγραφική επικράτηση, τα αποτελέσματα της ανάλυσης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο για την υποστήριξη της κλινικής ερμηνείας της νευροπάθειας από έναν ειδικό/εξειδικευμένο σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα του ασθενούς (βλ. 2).
- Η δοκιμασία αυτή δεν έχει επικυρωθεί για την πλασμαφαίρεση.
- Οι ενδοφλέβιες ανοσοσφαιρίνες (IVIg) ενδέχεται να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της εξέτασης.

## ΔΙΑΣΤΉΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΟΡΙΑ

Το διάστημα αναφοράς του anti-GM1 Antibodies ELISA καθορίστηκε σύμφωνα με το CLSI C28-A3 με 120 δείγματα ορού από υγιή άτομα που δηλώθηκαν από τους ίδιους. Η συχνότητα κατανομής των αντι-GM1-αντισωμάτων σε φυσιολογικούς αιμοδότες ταξινομήθηκε σε κατηγορίες τίτλων: αρνητικός (<30% αναλογία), γκρίζα ζώνη (30-50% αναλογία) και θετικός (>50% αναλογία). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 6. Η τιμή αποκοπής για τη θετικότητα είναι 50% της αναλογίας.

## ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

| **Γαγγλιοσίδιο** | **IgG ή IgM** | | |
|---|---|---|---|
| | **Τιμές (αναλογία % )** | | |
| | **<30** | **30-50** | **>50** |
| GM1 | Αρνητικό | Επανέλεγχος σε μεταγενέστερη χρονική στιγμή | Θετικό |

Πίνακας 3

Τα αποτελέσματα των εξετάσεων θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με τις διαθέσιμες πληροφορίες από την κλινική αξιολόγηση του ασθενούς και άλλες διαγνωστικές διαδικασίες.

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

**Ακρίβεια εντός του εργαστηρίου: 6,8 – 12,9% CV**
Η ενδοεργαστηριακή ακρίβεια καθορίστηκε σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή CLSI EP05-A3 χρησιμοποιώντας τον τυποποιημένο σχεδιασμό μελέτης 20 ημέρες x 2 εκτελέσεις x 2 επαναλήψεις. Εξετάστηκαν τρία (3) συγκεντρωτικά δείγματα ορού ασθενών. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 7.

**Αναπαραγωγιμότητα: 7,7 – 16,1% CV**
Η αναπαραγωγιμότητα καθορίστηκε σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή CLSI EP05-A3 χρησιμοποιώντας μελέτη με 3 όργανα/παρτίδα/χειριστή x 5 ημέρες x 5 επαναλήψεις. Εξετάστηκαν τρία (3) συγκεντρωτικά δείγματα ορού ασθενών. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο Πίνακας 8.

**Όριο τυφλού (LoB) ≤ Όριο ανίχνευσης (LoD): ≤30% Αναλογία**
Το LoB και το LoD καθορίστηκαν σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή CLSI EP17-A2 χρησιμοποιώντας τη μη παραμετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 9.

**Υψηλή δόση hook effect**
Δεν παρατηρήθηκε περιορισμός λόγω υψηλής δόσης hook effect στο εύρος μέτρησης.

**Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα**

Δεν παρατηρήθηκε συστηματική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για δείγματα από ασθενείς με διάφορες αυτοάνοσες νόσους (πίνακας 10) και από ασθενείς με άλλες νευρολογικές διαταραχές (πίνακας 11).

## ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΠΟΔΟΣΗ

Η κλινική απόδοση αξιολογήθηκε με περιγραφική ανάλυση επιστημονικής βιβλιογραφίας με αξιολόγηση από ομοτίμους. Τέσσερις (4) μελέτες ασχολήθηκαν με την κλινική απόδοση του Anti-GM1 Antibodies ELISA στη διάγνωση αυτοάνοσων περιφερικών νευροπαθειών (παραπομπές 3-6). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης και οι λεπτομέρειες των μελετών παρατίθενται στον πίνακα 4 και στον πίνακα 12, αντίστοιχα.

| | |
|---|---|
| N περιφερική νευροπάθεια | 148 (102 παιδιατρικό GBS, 14 CIDP, 32 GBS) |
| N μάρτυρες | 341 (70 DC, 142 NC, 129 HC) |
| Ευαισθησία, μέσος όρος (95% CI) | 48,7% (27,9 – 69,5%) |
| Ειδικότητα, μέσος όρος (95% CI) | 77,8% (60.9 – 94,7%) |

Πίνακας 4

GBS, σύνδρομο Guillain-Barré; CIDP, Χρόνια φλεγμονώδης απομυελινωτική πολυνευροπάθεια; DC, Έλεγχος μη νευρολογικής νόσου; NC, Νευρολογικός έλεγχος; HC, Υγιής έλεγχος; CI, Διάστημα εμπιστοσύνης

## ΠΑΡΕΜΒΑΙΝΟΥΣΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Η ευαισθησία της ανάλυσης σε από του στόματος και ενέσιμα φαρμακευτικά προϊόντα, καθώς και σε ενδογενείς ουσίες αξιολογήθηκε σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή EP07-A3 της CLSI. Η μεροληψία στα αποτελέσματα ≥ ± 20% αναλογία θεωρήθηκε ως παρεμβολή.

Δεν ανιχνεύθηκε παρεμβολή με τις ακόλουθες ουσίες έως τις αναφερόμενες συγκεντρώσεις: ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη (20 mg/mL), ριτουξιμάμπη (3 mg/mL), κλαδριβίνη (273 ng/mL), ιντερφερόνη άλφα-2α (49,5 ng/mL), γκαμπαπεντίνη (26,7 μg/mL), ιβουπροφαίνη (0,22 mg/mL), χλωραμβουκίλη (1,96 μg/mL), πρεδνιζόνη (99 ng/mL), πρεδνιζολόνη (1,2 μg/mL), ρευματοειδής παράγοντας (2340 IU/mL), αιμοσφαιρίνη (10 mg/mL), αιμολύτης (10 mg/mL), τριγλυκερίδια (15 mg/mL), συζευγμένη χολερυθρίνη (20 μg/mL), μη συζευγμένη χολερυθρίνη (150 μg/mL).

## ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΕΣ

### Παράδειγμα ρυθμίσεων της πλάκας μικροτιτλοδότησης για την μέτρηση IgG και IgM-ισότυπων των 4 δειγμάτων (σχήμα 1a) ή 36 δειγμάτων (σχήμα 1b)

| | IgG 1 | IgM 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Calibrator | CAL | CAL | | | | | | | | | | | A |
| Control | CTR Med | CTR Med | | | | | | | | | | | B |
| Control | CTRL Low | CTRL Low | | | | | | | | | | | C |
| Control | CTRL Neg | CTRL Neg | | | | | | | | | | | D |
| GM1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | E |
| GM1 | 2 | 2 | | | | | | | | | | | F |
| GM1 | 3 | 3 | | | | | | | | | | | G |
| GM1 | 4 | 4 | | | | | | | | | | | H |

Γράφημα 1a

| | IgG 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | IgM 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 | 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 | B |
| GM1 | 1 | 7 | 13 | 19 | 25 | 31 | 1 | 7 | 13 | 19 | 25 | 31 | C |
| GM1 | 2 | 8 | 14 | 20 | 26 | 32 | 2 | 8 | 14 | 20 | 26 | 32 | D |
| GM1 | 3 | 9 | 15 | 21 | 27 | 33 | 3 | 9 | 15 | 21 | 27 | 33 | E |
| GM1 | 4 | 10 | 16 | 22 | 28 | 34 | 4 | 10 | 16 | 22 | 28 | 34 | F |
| GM1 | 5 | 11 | 17 | 23 | 29 | 35 | 5 | 11 | 17 | 23 | 29 | 35 | G |
| GM1 | 6 | 12 | 18 | 24 | 30 | 36 | 6 | 12 | 18 | 24 | 30 | 36 | H |

Γράφημα 1b

### Παράδειγμα αποτελεσμάτων

| Σημασ-μένο Ένζυμο | απορρόφηση ($OD_{450}$) | | Αναλογίες [%] | |
|---|---|---|---|---|
| **B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM** | **IgG** | **IgM** | **IgG** | **IgM** |
| Βαθμονομητής | 2,397<br>2,449 | 2,269<br>2,343 | | |
| **Μέση τιμή Βαθμονομητή** | **2,423** | **2,306** | **100,0** | **100,0** |
| Μεσαίος Μάρτυρας | 1,612<br>1,543 | 1,583<br>1,658 | 67<br>64 | 69<br>72 |
| **Μέση τιμή μεσαίου μάρτυρα** | **1,577** | **1,620** | **65** | **70** |
| Χαμηλός Μάρτυρας | 0,694<br>0,714 | 0,805<br>0,817 | 29<br>29 | 35<br>35 |
| **Μέση τιμή χαμηλού μάρτυρα** | **0,704** | **0,811** | **29** | **35** |
| Αρνητικός Μάρτυρας | 0,055<br>0,064 | 0,091<br>0,090 | 2<br>3 | 4<br>4 |
| **Μέση τιμή αρνητικού μάρτυρα** | **0,059** | **0,090** | **2** | **4** |
| Δείγμα 1 | 0,783<br>0,802 | 2,197<br>1,988 | 32<br>33 | 95<br>86 |
| **GM1** | **0,793** | **2,095** | **33** | **91** |

Πίνακας 5

### Διάστημα αναφοράς

| | Σημα-σμένο Ένζυμο (Ισότυπος) | % φυσιολογικοί αιμοδότες σε κατηγορίες <30 % Αναλογία | 30 - 50 % Αναλογία | >50 % Αναλογία | Όριο αναφοράς (90% CI) |
|---|---|---|---|---|---|
| αντι-GM1 | IgG | 99,2 | 0,8 | 0,0 | 16 (13,0 – 29,8) |
| αντι-GM1 | IgM | 95,8 | 3,3 | 0,8 | 24 (14,3 – 40,3) |

Πίνακας 6

### Ακρίβεια εντός του εργαστηρίου

| Περιγραφή δείγματος | | | Ακρίβεια εντός του εργαστηρίου | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Σημα-σμένο Ένζυμο (Ισότυπος) | Προσδοκώμενη κατηγορία [%Αναλ-ογία] | N | Μέσος όρος [%Αναλ-ογία] | SD [%Αναλ-ογία] | CV [%] |
| αντι-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 |

Πίνακας 7

### Εργαστηριακή ακρίβεια

| Περιγραφή δείγματος | | | Αναπαραγωγιμότητα | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Σημασ-μένο Ένζυμο (Ισότυπος) | Προσδ-οκώμενη κατηγορία [%Αναλογία] | N | Μέσος όρος [%Ανα-λογία] | SD [%Ανα-λογία] | CV [%] |
| αντι-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 |

Πίνακας 8

### LoD και LoB

| | Σημασ-μένο Ένζυμο (Ισότυπος) | LoB [% Αναλογία] | LoD [% Αναλογία] |
|---|---|---|---|
| αντι-GM1 Ab | IgM | 5 | 21 |
| | IgG | 6 | 15 |

Πίνακας 9

## ΠΙΝΑΚΕΣ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΕΣ

### Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

| Εκχωρημένο αντίσωμα | Διάγνωση | # |
|---|---|---|
| Αντι-ουδετερόφιλο κυτταροπλασματικό αντίσωμα (ANCA) | Αγγειίτιδα | 3 |
| | Άλλα (δείγματα με θετική ένδειξη ANCA) | 10 |
| Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) | Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος | 5 |
| | Ρευματοειδής αρθρίτιδα | 9 |
| | σύνδρομο Sjogren | 6 |
| | Άλλα (δείγματα με θετική ένδειξη ANA) | 3 |
| Αντισώματα κατά της θυρεοσφαιρίνης (anti-Tg) | Αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα | 5 |
| Αντισώματα κατά της ριβονουκλεοπρωτεΐνης | Μικτή νόσο του συνδετικού ιστού | 1 |
| Anti-GQ1b, anti-GM1, anti-GD1b | Αυτοάνοσες περιφερικές νευροπάθειες | 1 |
| Αντισώματα κατά των υποδοχέων ακετυλοχολίνης και κινάση τυροσίνης ειδική για τους μύες | Βαρεία μυασθένεια | 7 |

Πίνακας 10

| Περιφερικές νευροπάθειες | # |
|---|---|
| Αλκοολικός | 1 |
| Διαβητικός | 5 |
| **Περιφερική νευροπάθεια που μιμείται διαταραχές** | **#** |
| Αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) | 15 |
| Σαρκοείδωση | 4 |
| Μακροσφαιριναιμία Waldenstrom (WM) | 4 |
| Νόσος Chagas | 5 |

Πίνακας 11

### Κλινική απόδοση

| Μελέτη | Θετικοί μάρτυρες (περιπτώσεις) | Αρνητικοί μάρτυρες | Επίτοπος | Ευαισθησία | Ειδικότητα |
|---|---|---|---|---|---|
| Hashemilar et al., 2014 | Παιδιατρικό GBS (n = 45) | DC (n = 35) | GM1 | 0,51 | 0,89 |
| Sharma et al., 2011 | Παιδιατρικό 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 |

Πίνακας 12

GBS, Σύνδρομο Guillain-Barré; DC, Έλεγχος μη νευρολογικής νόσου; NC, Νευρολογικός έλεγχος; HC, Υγιής έλεγχος; CIDP, Χρόνια φλεγμονώδης απομυελινωτική πολυνευροπάθεια

# anti-GM1 Antibodies ELISA

**Προεπικαλυμμένη πλάκα μικροτιτλοδότησης**

↓ *πλύση 2x με ≥300 µL (κρύο)! ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης*

**100 µL βαθμονομητή, μάρτυρων ή δείγματα ορού (1:50)**

↓ *επώαση 2 ώρες (±5 min) στους 2-8 °C*
*πλύση 3x με ≥300 µL (κρύο)! ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης*

**προσθήκη 100 µL σημασμένου ένζυμου**

↓ *επώαση 2 ώρες (±5 min) στους 2-8 °C*
*πλύση 3x με ≥300 µL (κρύο)! ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης*

**προσθήκη 100 µL Υπόστρωμα TMB (θερμοκρασία δωματίου)!**

↓ *επώαση 30 λεπτά (±2 min) στους 18-28 °C*
*σε αναδευτήρα πλάκας ~400-600 rpm*

**προσθήκη 100 µL ανασχετικού διαλύματος (θερμοκρασία δωματίου)!**

➡ **Ανάγνωση της απορρόφησης στα 450 nm (εντός 30 λεπτών)**

## ΧΡΟΝΟΣ ΜΕΧΡΙ ΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ: 4,5 ΩΡΕΣ

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. 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).

2. Bourque, P. R. et al. Autoimmune peripheral neuropathies. *Clinica Chimica Acta* **449**, 37–42 (2015).

3. Hashemilar, M. et al. Evaluating the status of antiganglioside antibodies in children with Guillain-Barré syndrome. *Neuroimmunomodulation* **21**, 64–68 (2013).

4. 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).

5. 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).

6. Khandelwal, D. et al. IgM anti-GM1 antibody titers in patients with monomelic amyotrophy. *Neurol. India* **54**, 399–401 (2006).

## ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΛΛΑΓΩΝ

| Ημερομηνία | Εκδοχή | Αλλαγή |
|---|---|---|
| 2023-08-17 | A2 | Αλλαγή στην *Προβλεπομενη χρηση* και το όνομα του προϊόντος<br>Επαναδιατύπωση της αρχής της ανάλυσης με κατηγορίες τίτλων αρνητική, γκρίζα ζώνη, θετική<br>Νέες σε χρήση σταθερότητες αντιδραστηρίων<br>Ενημέρωση στο κεφάλαιο *Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις*<br>Αναθεώρηση κεφαλαίων *Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων, Διαδικασία Δοκιμασίας,* και *Τυποποίηση και μετρολογική ιχνηλασιμότητα*<br>Αναδιατύπωση κεφαλαίων *Ποιοτικός Έλεγχος*<br>Ενημέρωση στο κεφάλαιο *Περιορισμοί*<br>Αναθεώρηση κεφαλαίων *Διαστήματα αναφοράς, χαρακτηριστικά απόδοσης* και *παρεμβαλλόμενες ουσίες*<br>Εισαγωγή του κεφαλαίου Κλινική απόδοση<br>Αναθεώρηση κεφαλαίων *αναφορές* και *σύμβολα*<br>Συμπερίληψη του αριθμού κοινοποιημένου οργανισμού στο σήμα CE – διαδικασία αξιολόγησης συμμόρφωσης σύμφωνα με το IVDR 2017/746 |

## ΑΝΑΦΟΡΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΚΡΑΤΗ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΕ

Εάν έχει συμβεί οποιοδήποτε σοβαρό περιστατικό σε σχέση με αυτήν τη συσκευή, αναφέρετε χωρίς καθυστέρηση στον κατασκευαστή και την αρμόδια αρχή του κράτους μέλους σας.

## ΖΗΜΙΑ ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ

Παρακαλούμε ενημερώστε τον διανομέα σας, εάν αυτό το προϊόν παραλήφθηκε κατεστραμμένο.

## ΣΥΜΒΟΛΑ

Η BÜHLMANN χρησιμοποιεί σύμβολα και σημεία που παρατίθενται και περιγράφονται στο ISO 15223-1. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα σύμβολα και σημεία:

| **Σύμβολο** | **Εξήγηση** |
|---|---|
| MP | Πλάκα μικροτιτλοδότησης |
| BUF WASH 10X | Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (10x) |
| BUF INC | Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης |
| CAL | Βαθμονομητής |
| CONTROL - | Αρνητικός Μάρτυρας |
| CONTROL L | Χαμηλός Μάρτυρας |
| CONTROL M | Μεσαίος Μάρτυρας |
| EL IgG | Σημασμένο Ένζυμο IgG |
| EL IgM | Σημασμένο Ένζυμο IgM |
| SUBS TMB | Υπόστρωμα TMB |
| SOLN STOP | Ανασχετικό διάλυμα |

CE 0123