Anti-GM1 Antibodies ELISA

ze znakowanymi enzymem IgG i IgM

Wykrywanie przeciwciał anty-gangliozydowych M1 za pomocą testu ELISA (GM1)

Do diagnostyki *in vitro*

EK-GM1-GM 96 testów

Data wydania: 2023-08-17
Wersja A2

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

POLSKI

PRZEZNACZENIE

Anti-GM1 Antibodies ELISA jest testem diagnostycznym *in vitro* do półilościowego oznaczania przeciwciał IgG i/lub IgM przeciwko wybranym antygenom/epitopom neuronalnym GM1 w próbkach surowicy. Wyniki testu mogą służyć jako pomoc w diagnozowaniu autoimmunologicznych neuropatii obwodowych w połączeniu z innymi wynikami klinicznymi i laboratoryjnymi.
Tylko do użytku laboratoryjnego.

ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Test anti-GM1 Antibodies ELISA umożliwia pomiar przeciwciał przeciwko GM1 (gangliozyd M1) w surowicy. Płytka do mikromiareczkowania jest pokryta gangliozydami: GM1.
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, anty-IgM) skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP) wykrywają przeciwciała anty-GM1 związane z unieruchomionym gangliozydem GM1 na płytce. Po kolejnych 2 godzinach inkubacji i dalszych etapach przemywania, dodaje się chromogeniczny substrat HRP, tetrametylobenzydynę (TMB) (tworzenie się niebieskiego zabarwienia), po czym następuje zatrzymanie reakcji (zmiana koloru na żółty). Absorpcję mierzy się przy 450 nm.
Zmierzona absorbancja jest proporcjonalna do miana przeciwciał anty-GM1 obecnych w danej próbce. Miana przeciwciał są wyrażone jako % stosunki kalibratora i mogą być przypisane do kategorii miana (negatywne, szara strefa, pozytywne).

DOSTARCZONE ODCZYNNIKI I ICH PRZYGOTOWANIE

Odczynniki	Ilość	Kod	Rekonstytucja
Płytka do mikromiareczkowania wstępnie opłaszczona GM1	12 x 8 dołkowe paski z ramką	B-GM1-MP	Gotowy do użycia
Folia do płytek	3 sztuki		
Koncentrat buforu płuczącego (10x) z środkami konserwującymi	1 butelka 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
Znakowane enzymem IgG anty-ludzkie przeciwciało IgG skoniugowane z HRP w matrycy buforowej ze środkami konserwującymi	1 fiolka x 11 mL	B-GCO-ELG	Gotowy do użycia
Oznakowany enzym IgM anty-ludzkie przeciwciało 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	1 fiolka x 11 mL	B-TMB	Gotowy do użycia
Roztwór zatrzymujący reakcję 0.25 M kwas siarkowy	1 fiolka x 11 mL	B-STS	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 / rekonstytuowane odczynniki	
Płytka do mikromiareczkowania	Niezużyte stripy natychmiast włożyć z powrotem do torebki foliowej zawierającej saszetki ze środkiem osuszającym i ponownie szczelnie zamknąć wzdłuż całej krawędzi torebki. 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	
SubstratTMB	
Kalibrator	
Kontrole	
Roztwór zatrzymujący reakcję	Przechowywać do 6 miesięcy w temperaturze 18-28 °C.

Tabela 2

NIEZBĘDNE MATERIAŁY, KTÓRE NIE ZOSTAŁY DOSTARCZONE

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

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Środki ostrożności

- Kalibrator i kontrole tego zestawu zawierają składniki pochodzenia ludzkiego. Chociaż testy na obecność HBV, HCV i HIV1/2 dały wynik ujemny, to z odczynnikami należy obchodzić się tak, jakby były zdolne do przenoszenia infekcji, czyli zgodnie z zasadami Dobrej

Praktyki Laboratoryjnej (GLP), stosując odpowiednie środki ostrożności.

- Zestaw zawiera składniki sklasyfikowane zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008:
  - Roztwór zatrzymujący reakcję zawiera kwas siarkowy (stęż. 2,5 – 5%), w związku z tym, odczynniki mogą wywoływać podrażnienie skóry (H315), silne podrażnienie oczu (H319), i mogą powodować korozję metali (H290).
  - Kalibrator, kontrole i enzymatyczne znaczniki zawierają chlorowodorek 2-metylo-4-izotiazolin-3-onu (stęż. ≥ 0,0015%), w związku z tym, odczynniki mogą powodować reakcje alergiczne skóry (H317).
  - Bufor inkubacyjny i bufor płuczący zawierają siarczan gentamycyny, w związku z tym, odczynniki mogą powodować reakcje alergiczne skóry (H317).
- Unikać kontaktu odczynników ze skórą, oczami lub błonami śluzowymi. W przypadku kontaktu, natychmiast przemyć narażone miejsce dużą ilością wody; w przeciwnym razie może dojść do podrażnienia/oparzeń.
- Odczynniki i chemikalia należy traktować jako odpady niebezpieczne zgodnie z krajowymi wytycznymi lub przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa biologicznego.

Techniczne środki ostrożności

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

Procedura testu ELISA

Temperatura odczynników

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

Etapy płukania

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

Inkubacja substratu

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

Elementy zestawu

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

POBIERANIE PRÓBEK I ICH PRZECHOWYWANIE

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

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

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

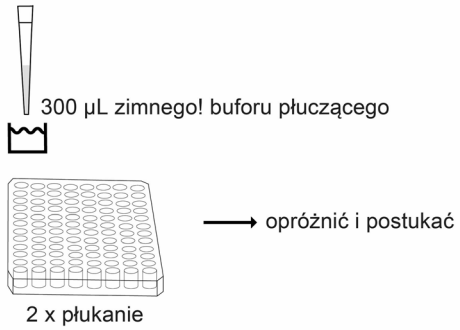
PROCEDURA WYKONANIA TESTU

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

1. Rozcieńczyć próbki w stosunku 1:50 z buforem inkubacyjnym. Należy użyć np. 10 µL surowicy + 490 µL zimnego! (2-8 °C) buforu inkubacyjnego. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie i pozostawić rozcieńczone próbki, jak również rekonstytuowany kalibrator i kontrole w temperaturze 2-8 °C na 30 minut przed pipetowaniem należy odnieść.
2. Przygotować ramkę płytki z wystarczającą ilością pasków do przetestowania wymaganej liczby kalibratorów, kontroli i próbek. Usunąć nadmiar pasków z ramki i bezzwłocznie zamknąć je ponownie w torebce foliowej wraz ze środkiem pochłaniającym wilgoć. Przechowywać w warunkach chłodniczych.

Uwaga: W etapach 3 do 9 użyć zimnych odczynników.

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



Uwaga: Natychmiast przejść do kolejnych etapów.

Detekcja izotypu IgG:

4a. Dodać 100 µL kalibratora do studzienki A1 (odnieść się do ryciny 1a).

4b. Dodać 100 µL kontroli średniej do studzienki B1, kontroli niskiej do studzienki C1 i kontroli negatywnej do studzienki D1 (odnieść się do ryciny 1a).

4c. Dodać 100 µL rozcieńczonej próbki 1 do studzienki E1 (odnieść się do ryciny 1a).

4d. Dodać 100 µL rozcieńczonej próbki 2 do studzienek F1 (odnieść się do ryciny 1a).

4e. Dodać 100 µL rozcieńczonych próbek x-y do kolejnych studzienek (odnieść się do ryciny 1a).

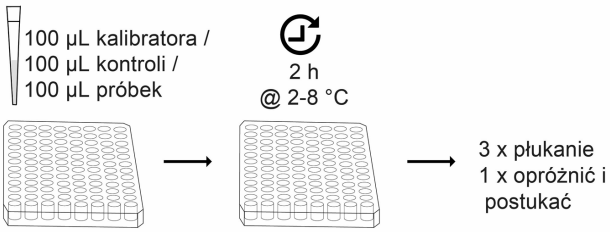
Detekcja izotypu IgM

4f. Powtórzyć etapy 4a-4e przy wykorzystaniu kolejnych studzienek.

Uwaga: Kalibrator i kontrole powinny być badane osobno dla izotypów IgG i IgM. Jeżeli wykorzystano więcej niż trzy paski na serię, zalecamy badanie kalibratora i kontroli w duplikatach. Odnieść się do ryciny 1b dla alternatywnego schematu pipetowania.

5. Przykryć płytkę folią do płytek i inkubować przez 2 godziny (±5 min) w temperaturze 2-8 °C (nie wstrząsać płytki).

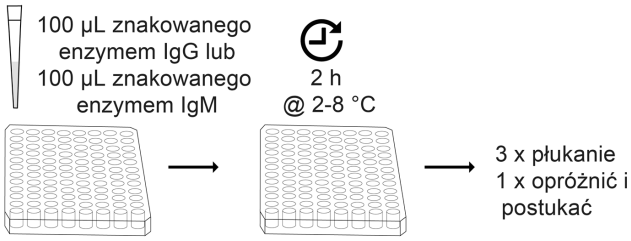
6. Zdjąć folię z płytki. Opróżnić studzienki i przepłukać trzy razy przy użyciu co najmniej 300 µL zimnego! (2-8 °C) buforu płuczącego na studzienkę. Opróżnić studzienki i mocno stuknąć płytką o bibułę w celu całkowitego pozbycia się buforu płuczącego.



7. Dodać 100 µL <u>znakowanego enzymem IgG</u> lub <u>IgM</u> do odpowiednich studzienek (odnieść się do ryciny 1).

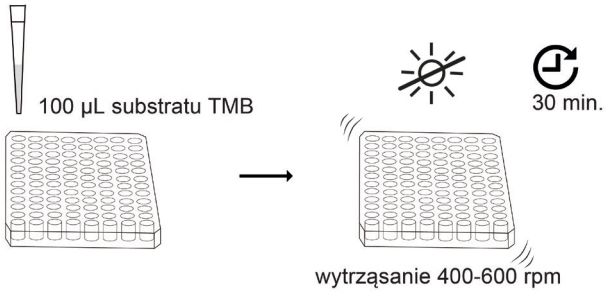
8. Przykryć płytkę folią do płytek i inkubować przez 2 godziny (±5 min) w temperaturze 2-8 °C (nie wstrząsać płytki).

9. Zdjąć folię z płytki. Opróżnić studzienki i przepłukać trzy razy przy użyciu co najmniej 300 µL zimnego! (2-8 °C) buforu płuczącego na studzienkę. Opróżnić studzienki i postukać mocno płytką w bibułę.



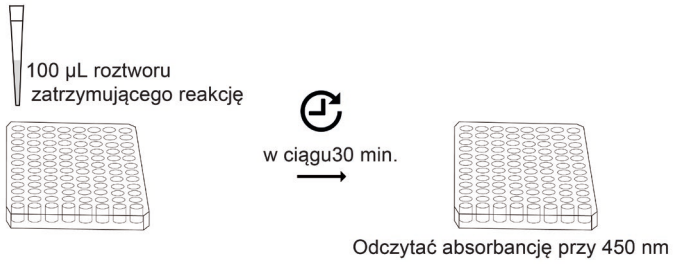
10. Dodać 100 µL roztworu substratu TMB (zrównoważonego do temperatury pokojowej) do każdej studzienki.

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



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

13. 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 anti-GM1 Antibodies ELISA zawiera trzy kontrole: negatywną, niską i średnią. Kontrolom przypisano zakresy wartości (stosunek %) wskazane w arkuszu danych QC dostarczonym z każdym zestawem. Pomiary kontrolne muszą mieścić się we wskazanych zakresach wartości, aby uzyskać prawidłowe wyniki. Oprócz kontroli z zestawu, zaleca się stosowanie pul surowicy do wewnętrznej kontroli jakości.

Dla kalibratora zalecana jest minimalna wartość OD_{450nm} wynosząca 1,2.

Charakterystyka wydajności powinna mieścić się w ustalonych granicach. Jeżeli wydajność testu nie spełnia ustalonych limitów, a powtarzalność wykluczyła błędy techniczne, należy sprawdzić następujące kwestie: i) kontrolowanie temperatury (odczynniki stosowane w etapach 3-9 przechowywać w temperaturze 2-8 °C) ii) dokładność termometrów, pipet i czasomierzy; iii) ustawienia czytnika ELISA; iv) daty ważności odczynników v) warunki przechowywania i inkubacji; vi) kolor roztworu substratu TMB (powinien być bezbarwny); vii) czystość wody; viii) metody aspiracji i płukania.

STANDARYZACJA I ZGODNOŚĆ METROLOGICZNA

Nie ma uznanych w skali międzynarodowej i krajowej referencyjnych materiałów ani referencyjnych procedur pomiarowych dla przeciwciał anty-gangliozydowych w próbkach surowicy. Zestaw anti-GM1 Antibodies ELISA jest standaryzowany względem wewnętrznie ustalonego

materiału referencyjnego. Wartości kalibratorów są przypisywane zgodnie z protokołem transferu wartości (ref. 1), w celu zagwarantowania spójności metrologicznej i są podawane w dowolnych jednostkach “stosunku %”.
95% przedział ufności łącznej niepewności kalibratorów produktu został określony jako 29,3% dla przeciwciał IgG i 37,6% dla przeciwciał IgM.

OBLICZANIE WYNIKÓW TESTU

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

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

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

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

Uwaga: Wyniki zaprezentowane w tabelach 5 są przykładami i są dostarczone tylko dla celów pokazowych.

OGRANICZENIA

- 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. 2).
- 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 anti-GM1 Antibodies ELISA został ustalony zgodnie z CLSI C28-A3 dla 120 próbek surowicy od osób deklarujących się jako zdrowe. Częstość występowania przeciwciał anty-GM1 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 6. Wartość cut-off dla wyniku pozytywnego wynosi stosunek 50%.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Gangliozyd	**IgG lub IgM**		
	Wartości (stosunek %)		
	<30	**30-50**	**>50**
GM1	Negatywny	Przetestować ponownie w późniejszym czasie	Pozytywny

Tabela 3

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

CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCI

Precyzja wewnątrzlaboratoryjna: 6,8 – 12,9% 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 7.

Odtwarzalność: 7,7 – 16,1% 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 8.

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 9.

“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 10) i od pacjentów z innymi zaburzeniami neurologicznymi (tabela 11).

WYDAJNOŚĆ KLINICZNA

Wydajność kliniczna została oceniona na podstawie podsumowującej analizy recenzowanej literatury naukowej. Cztery (4) badania dotyczyły wydajności klinicznej testu Anti-GM1 Antibodies ELISA w diagnostyce autoimmunologicznych neuropatii obwodowych (ref. 3-6). Wyniki analizy i szczegóły badania przedstawiono odpowiednio w tabeli 4 i tabeli 12.

N neuropatia obwodowa	148 (102 pediatryczne GBS, 14 CIDP, 32 GBS)
N kontrole	341 (70 DC, 142 NC, 129 HC)
Czułość, średnia (95% CI)	48,7 % (27,9 – 69,5 %)
Specyficzność, średnia (95% CI)	77,8 % (60,9 – 94,7 %)

Tabela 4

GBS, Guillain-Barré-Syndrom; CIDP, Przewlekła zapalna polineuropatia; DC, Kontrola chorób nieneurologicznych; NC, Kontrola Neurologiczna; HC, Zdrowa Kontrola; CI, przedział ufności

SUBSTANCJE INTERFERUJĄCE

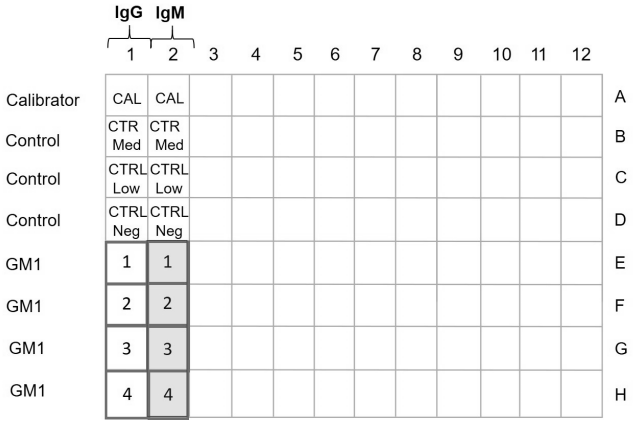
Wrażliwość testu na farmaceutyki podawane doustnie i we wstrzyknięciach oraz na substancje endogenne oceniono zgodnie z wytycznymi CLSI EP07-A3. Błąd systematyczny wyników ≥ ± 20% stosunku uznano za interferencję.

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

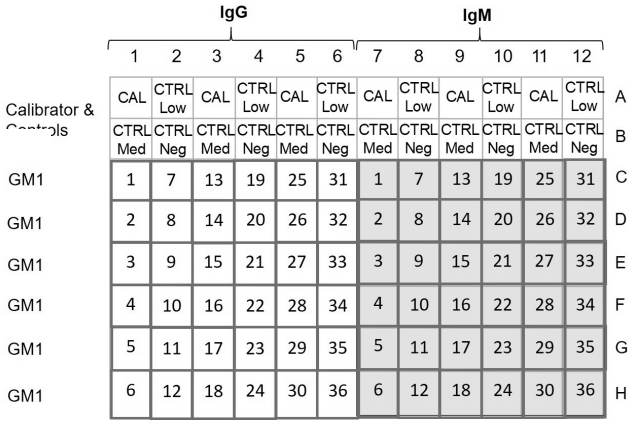
rytuksymab (3 mg/mL), kladrybina (273 ng/mL), Interferon alfa-2a (49,5 ng/mL), gabapentyna (26,7 µg/mL), ibuprofen (0,22 mg/mL), chlorambucyl (1,96 µg/mL), prednizon (99 ng/mL), prednizolon (1,2 µg/mL), czynnik reumatoidalny (2340 IU/mL), hemoglobina (10 mg/mL), hemolizat (10 mg/mL), triglicerydy (15 mg/mL), związana bilirubina (20 µg/mL), niezwiązana bilirubina (150 µg/mL).

TABELE I RYCINY

Przykłady konfiguracji płytek do mikromiareczkowania do pomiaru izotypów IgG i IgM dla 4 próbek (rycina 1a) lub 36 próbek (rycina 1b)



Rycina 1a



Rycina 1b

Przykład wyników

Enzymatyczny znacznik	Absorbancja (OD450)		Stosunek [%]	
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM	IgG	IgM	IgG	IgM
Kalibrator	2,397 2,449 **2,423**	2,269 2,343 **2,306**	**100,0**	**100,0**
Średnia kontrola Średnia wartość średniej kontroli	1,612 1,543 **1,577**	1,583 1,658 **1,620**	67 64 **65**	69 72 **70**
Kontrola niska Średnia wartość niskiej kontroli	0,694 0,714 **0,704**	0,805 0,817 **0,811**	29 29 **29**	35 35 **35**
Kontrola negatywna Średnia wartość negatywnej kontroli	0,055 0,064 **0,059**	0,091 0,090 **0,090**	2 3 **2**	4 4 **4**
Próbka 1 GM1	0,783 0,802 **0,793**	2,197 1,988 **2,095**	32 33 **33**	95 86 **91**

Tabela 5

Przedziały referencyjne

	Enzymatyczny znacznik (Izotyp)	% zwykłych krwiodawców w kategoriach			Limit referencyjny (90% CI)
		<30% stosunek	(90% CI)	<30% stosunek	
anty-GM1 Ab	IgG	99,2	0,8	0,0	16 (13,0 – 29,8)
	IgM	95,8	3,3	0,8	24 (14,3 – 40,3)

Tabela 6

Precyzja wewnątrzlaboratoryjna

Opis próbki			Precyzja wewnątrzlaboratoryjna y			
	Enzymatyczny znacznik (Izotyp)	Oczekiwana kategoria [% stosunek]	N	Średnia [% stosunek]	SD [% stosunek]	CV [%]
anty-GM1 Ab	IgM	30-50	80	48	3,5	7,2
		>50	80	91	6,2	6,8
	IgG	30-50	80	40	5,1	12,9
		>50	80	106	13,1	12,4

Tabela 7

Odtwarzalność

Opis próbki			Odtwarzalność			
	Enzymatyczny znacznik (Izotyp)	Oczekiwana kategoria [%stosunek]	N	Średnia [%stosunek	SD [%stosunek]]	CV [%]
anty-GM1 Ab	IgM	30-50	75	51	4,9	9,7
		>50	75	94	7,2	7,7
	IgG	30-50	75	39	5,6	14,5
		>50	75	106	17,1	16,1

Tabela 8

LoD i LoB

	Enzymatyczny znacznik (Izotyp)	LoB [% Stosunek]	LoD [% Stosunek]
anty-GM1 Ab	IgM	5	21
	IgG	6	15

Tabela 9

Reaktywność krzyżowa

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

Tabela 10

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 11

Wydajność kliniczna

Badanie	Kontrole pozytywne (Przykłady)	Kontrole negatywne	Epi-top	Czułość	Specy-ficzność
Hashemilar et al., 2014	Pediatrycz GBS (n = 45)	DC (n = 35)	GM1	0,51	0,89
Sharma et al., 2011	Pediatrycz 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

Tabela 12

GBS, Guillain-Barré-Syndrom; DC, Kontrola chorób nieneurologicznych; NC, Kontrola Neurologiczna; HC, Zdrowa Kontrola; CIDP, Przewlekła zapalna polineuropatia demielinizacyjn

anti-GM1 Antibodies ELISA

Wstępnie powlekana płytka do mikromiareczkowania

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

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

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

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

dodać 100 µL enzymatycznych znaczników

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

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

dodać 100 µL substratu TMB (temperatura otoczenia)!

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

dodać 100 µL roztworu zatrzymującego reakcję (temperatura otoczenia)!

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

CZAS DO OTRZYMANIA WYNIKÓW: 4,5 GODZINY

REFERENCJE

1. 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).

LISTA ZMIAN

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

RAPORTOWANIE WYPADKÓW W PAŃSTWACH CZŁONKOWSKICH UE

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

USZKODZENIE PRZESYŁKI

Jeżeli produkt został uszkodzony należy poinformować o tym dystrybutora.

SYMBOLE

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

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

CE 0123