



# BÜHLMANN GanglioCombi<sup>®</sup> 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: 2023-08-17  
Verze A1



**Výrobce**  
**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 pro semikvantitativní stanovení IgG a/nebo IgM protilátek proti vybraným neurálním antigenům/epitopům ve vzorcích séra. Výsledky testu lze použít k podpoře diagnózy autoimunitních periferních neuropatií ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními nálezy.

Pouze pro laboratorní účely.

## 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 křečovou 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, tetrametylbendidin (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
<b>Mikrotitrační destička</b> předem potažená gangliosidy a HNK-1	2 x 12 x 8 jamek s rámečkem	B-GCM-MP	Připraveno k použití
<b>Lepicí fólie</b>	6 kusy		
<b>Konzentrát promývacího roztoku (10x)</b> s konzervačními látkami	2 láhve x 100 mL	B-GCO-WB	Zředte 900 mL deionizované vody
<b>Inkubační roztok</b> s konzervačními látkami	1 láhev x 100 mL	B-GCO-IB	Připraveno k použití
<b>Kalibrátory</b> lyofilizované s konzervačními látkami	1 lahvička	B-GCO-CA	Přidejte 1,5 mL inkubačního roztoku
<b>Kontroly negativní, nízká a střední<sup>1</sup></b> lyofilizované s konzervačními látkami	3 lahvičky	B-GCO-CONSET	Přidejte 1,5 mL inkubačního roztoku
<b>Směs IgG/IgM označená enzymem</b> 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
<b>Enzymová značka IgG</b> protilátka proti lidskému IgG konjugovaná s HRP v roztoku s konzervačními látkami	1 lahvička x 11 mL	B-GCO-ELG	Připraveno k použití
<b>Enzymová značka IgM</b> protilátka proti lidskému IgM konjugovaná s HRP v roztoku s konzervačními látkami	1 lahvička x 11 mL	B-GCO-ELM	Připraveno k použití
<b>Substrát TMB</b> TMB v citrátovém pufru	2 lahvičky x 11 mL	B-TMB	Připraveno k použití
<b>Zastavovací roztok</b> 0,25 M kyselina sírová	2 lahvičky x 11 mL	B-ST5	Připraveno k použití <b>Žiravina</b>

Tabulka 1

<sup>1</sup> 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	Skladujte až 6 měsíců při teplotě 18-28 °C.
Zastavovací roztok	

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 zkumavky 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 shledány negativními na HBV, HCV a HIV1/2, mělo by se s činidly 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 (koncentrace  $\geq 0,0015\%$ ), proto mohou činidla vyvolat alergické kožní reakce (H317).
  - Inkubační roztok a promývací roztok obsahují gentamicin sulfát, proto mohou tato činidla vyvolat alergickou kožní reakci (H317).
- Zabraňte kontaktu činidel s kůží, očima nebo sliznicemi. Dojde-li ke kontaktu s činidlem, okamžitě je omyjte velkým množstvím vody, jinak může dojít k podráždění / popálení.
- S činidly 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 činidla 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 činidel

- Před zahájením postupu analýzy si připravte činidla. 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 činidel.
- Je třeba vynaložit veškeré úsilí, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi činidly, vzorky nebo jamkami.
- Mikrotitrační jamky nelze použít opakovaně.

## ODBĚR A SKLADOVÁNÍ

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

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

Vzorky séra lze skladovat při teplotě 2-8 °C po dobu až osmi týdnů, při teplotě 28 °C po dobu až jednoho týdne a při teplotě  $\leq 20$  °C po dobu 16 týdnů. 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).*

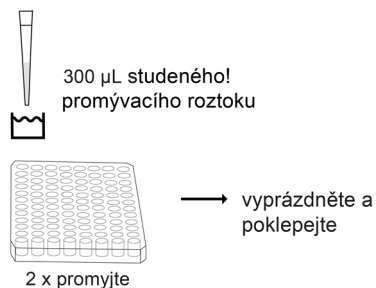
1. Vzorky nařeďte v poměru 1:50 s inkubačním roztokem. Použijte např. 20 µL séra + 980 µL studeného! (2-8 °C) inkubačního pufru. Důkladně promíchejte vortexováním a naředěné vzorky i rekonstituovaný kalibrátor a kontroly

nechte před pipetováním 30 minut při teplotě 2-8 °C (viz krok 4a a b).

- 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 °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).

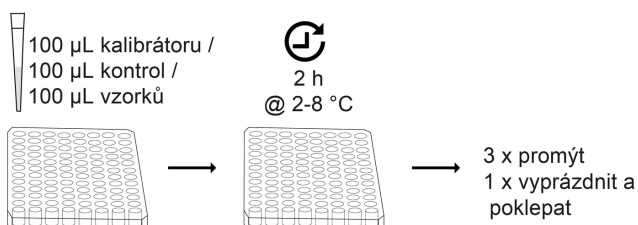
*Poznámka k variantě 1: Pokud se v jedné sérii používají více než tři stripy, lze kalibrátor a kontroly testovat duplicitně (viz obrázek 1A).*

*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 °C (destičkou netřepejte).
- Sejměte lepicí fólii z destičky. Vyprázdněte jamky a třikrát je promyjte pomocí nejméně 300 µL studeného! (2-8 °C) promývacího roztoku na jamku. Vyprázdněte jamky a pevně poklepejte destičkou na blotovací papír, aby se promývací roztok zcela odstranil.



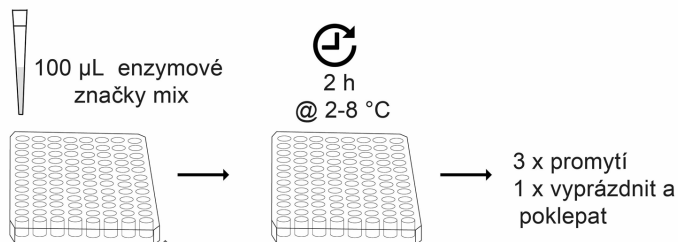
### Pro variantu 1: Detekce mix-izotypu

- Do jamek přidejte 100 µL směsi.

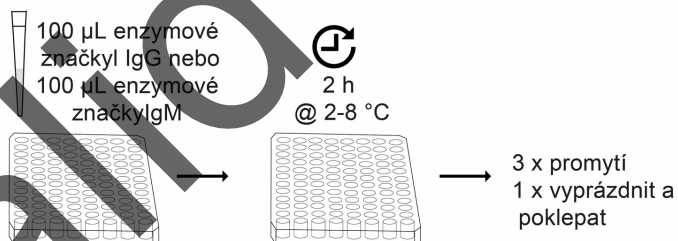
### Pro variantu 2: Detekce izotypů IgG nebo IgM

- 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 °C (destičkou netřepejte).
- Sejměte lepicí fólii z destičky. Vyprázdněte jamky a třikrát je promyjte pomocí nejméně 300 µL studeného! (2-8 °C) promývacího roztoku na jamku. Vyprázdněte jamky a pevně poklepejte destičkou na blotovací papír.

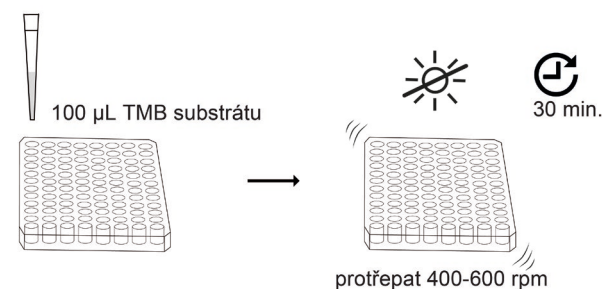
Pro variantu 1



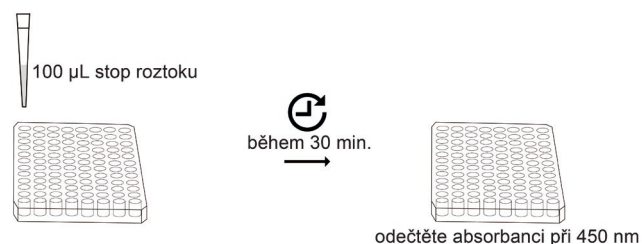
Pro variantu 2



- 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 °C po dobu 30 ± 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<sub>450nm</sub> 1,2. Výkonnostní charakteristiky by měly být ve stanovených mezích. Pokud provedení testu nespĺňuje 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 čidel; 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

absorbance vzorků nebo kontrol

% Poměr: \_\_\_\_\_ x 200  
absorbance kalibrátoru

### IgG a IgM izotypy

absorbance vzorků nebo kontrol

% Poměr : \_\_\_\_\_ x 100  
absorbance kalibrátoru

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 %)
Specifita (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), hemolyzát (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	2,179 2,477	100
Kalibrátor prům.	2,328	
Střední kontrola	1,737 1,891	78
Střední kontrola prům.	1,814	
Nízká kontrola	0,662 0,460	24
Nízká kontrola prům.	0,561	
Negativní kontrola	0,044 0,046	2
Negativní kontrola prům.	0,045	
Vzorek 1 HNK-1	0,234	10
Vzorek 1 GM1	0,543	23
Vzorek 1 GT1a	1,976	85
Vzorek 1 GD1a	0,621	27
Vzorek 1 GD1b	0,734	32
Vzorek 1 GQ1b	2,573	111

Tabulka 7

#### B Označení IgG & IgM

Označení enzymu	Absorbance (OD450)		Poměr [%]	
	IgG	IgM	IgG	IgM
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM				
Kalibrátor	2,488 2,446	2,411 2,201	100	100
Kalibrátor prům.	2,467	2,306		
Střední kontrola	1,879 1,987	1,734 1,818	78	77
Střední kontrola prům.	1,933	1,776		
Nízká kontrola	0,452 0,716	0,501 0,609	24	24
Nízká kontrola prům.	0,584	0,555		
Negativní kontrola	0,045 0,037	0,048 0,042	2	2
Negativní kontrola prům.	0,041	0,045		
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) <sup>F</sup> 18 (6,6 – 24,3) <sup>M</sup>
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) <sup>F</sup> 9 (6,4 – 54,7) <sup>M</sup>
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 Mix vs. EK-MAG	122	0,87	0,78 - 0,96	97,0%	89,5% - 99,6%	89,8%	78,1% - 96,0%

Tabulka 10

NPA: Negativní procentuální shoda

PPA: Pozitivní procentuální shoda

CI: Interval spolehlivosti

## Přesnost v rámci laboratoře

Analyt	Enzymová značka (izotyp)	Předpok. kategorie [%poměr]	V rámci laboratoře Precision			
			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

Analyt	Enzymová značka (izotyp)	Předpok. kategorie [%poměr]	Opakovatelnost			
			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
<b>Periferní neuropatie imitující poruchy</b>	<b>#</b>
Amyotrofická laterální skleróza (ALS)	15
Sarkodióza	4
Waldenströmova makroglobulinemie (WM)	4
Chagasova choroba	5

Tabulka 15

Klinický výkon

Studie	Pozitivní kontroly (Případy)	Negativní kontroly	Epitopy	Sensitivita	Specifita
Hashemilar et al., 2014	Pediatrická GBS (n = 45)	DC (n = 35)	GM1	0,51	0,89
			GQ1b	0,56	0,74
Sharma et al., 2011	Pediatrická 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.

invalid

## BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA

Předem potažená mikrotitrační destička



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

100  $\mu\text{L}$  kalibrátoru, kontrol nebo vzorků séra (1:50)



*incubate 2 hours ( $\pm 5$  min) at 2-8 °C  
promyjte 3 x s  $\geq 300 \mu\text{L}$  (studeného)! Promývacího roztoku*

přidejte 100  $\mu\text{L}$  enzymové značky



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

přidejte 100  $\mu\text{L}$  TMB substrátu (pokojová teplota)!



*inkubujte 30 min ( $\pm 2$  min) při 18-28 °C  
na třepačce  $\sim 400$ -600 rpm*

přidejte 100  $\mu\text{L}$  zastavovacího roztoku (pokojová teplota)!

➔ Odečtěte absorbanci při 450 nm (do 30 minut)

**DOBA DOSAŽENÍ VÝSLEDKU: 4,5 HODINY**

## 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
2023-08-17	A1	Změna <i>Určené použití</i> a názvu výrobku Odstranění gangliosidu GM2 a zavedení gangliosidu GT1a Přeformulování <i>Princip testu</i> s kategoriemi titrů negativní, šedá zóna, pozitivní Nová stabilita používaných činidel Aktualizace kapitoly <i>Upozornění a opatření</i> Revize kapitol <i>Odběr a skladování</i> , <i>Postup testu</i> , a <i>Standardizace a metrologická návaznost</i> Přeformulování kapitoly <i>Kontrola kvality</i> Aktualizace kapitoly <i>Omezení</i> Revize kapitol <i>Referenční intervaly a mezní hodnoty</i> , <i>Výkonnostní charakteristiky</i> , a <i>Interferující látky</i> Zavedení kapitoly <i>Klinický výkon</i> Revize kapitol <i>Reference</i> a <i>Symbols</i> Přidání čísla oznámeného subjektu k označení CE - postup posuzování shody podle IVDR 2017/746

## 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. Kromě toho se používají následující symboly a značky:

Symbol	Vysvětlení
MP	Mikrotitrační destička
BUF WASH 10X	Koncentrát 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

CE 0123