



BÜHLMANN GanglioCombi[®] MAG ELISA

ar enzīmu marķieriem IgG/IgM Mix, IgG un IgM

Anti-gangliozīdu un -MAG antivielu
noteikšana ar ELISA
(HNK-1 ("MAG"), GM1, GT1a, GD1a, GD1b un GQ1b)

In vitro diagnostikai

EK-GCM 2 x 96 testi

Publicēšanas datums: 2023-08-17
Versija A1



BÜHLMANN Laboratories AG

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

PAREDZĒTAIS LIETOJUMS

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA ir *in vitro* diagnostikas tests daļēji kvantitatīvai IgG un/vai IgM antivielu noteikšanai pret izraudzītiem nervu antigēniem/epitopiem seruma paraugos. Analīzes rezultātus var izmantot autoimūno perifēro neiropatiju diagnozes apstiprināšanai kopā ar citiem klīniskiem un laboratoriskiem datiem.

Tikai lietošanai laboratorijā.

PAREDZĒTAIS PIELIETOJUMS

Komplektā iekļautie trīs enzīmu marķieri ļauj izmantot trīs dažādus testēšanas algoritmus:

1. Testēšana ar IgG/IgM konjugātu maisījumu (turpmāk tekstā – maisījumu) ļauj noteikt, vai ir antivielas, kas liecina par autoimūnu neiropatiju.
2. Testēšana ar atsevišķiem IgG un/vai IgM konjugātiem ļauj noteikt antivielu izotipu.
3. Laboratorijas apstrādei sākotnējam parauga skrīnings, izmantojot maisījumu (1. iespēja), ja nepieciešams, var sekot maisījuma pozitīvo paraugu diferenciacija, izmantojot atsevišķus IgG un IgM konjugātus (2. iespēja).

PĀRBAUDES PRINCIPS

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA ļauj noteikt gangliozīdu un ar mielīnu saistīto glikoproteīna (MAG) antivielas serumā. Mikrotitrēšanas plate ir pārklāta ar gangliozīdiem: GM1, GT1a, GD1a, GD1b, GQ1b un ķīmiski sintezētu MAG glikoproteīna HNK-1 epitopu (1. atsauce).

Mikrotitrēšanas plates iedobēs pievieno pacientu serumus, kontroles un kalibratoru. Pēc 2 stundu inkubācijas 2-8 °C temperatūrā un mazgāšanas posmiem ar mārūtku peroksidāzi (HRP) konjugētās noteikšanas antivielas (anti-IgG/IgM, anti-IgG, anti-IgG, anti-IgM) nosaka antigangliozīdu un/vai anti-MAG antivielas, kas ir piesaistītas imobilizētajiem gangliozīdiem vai HNK-1 uz plates. Pēc vēl 2 stundu ilgas inkubācijas un turpmākajiem mazgāšanas posmiem pievieno hromogēno HRP substrātu, tetrametilbenzidīnu (TMB) (veidojas zila krāsa), kam seko apturēšanas reakcija (mainās uz dzeltenu krāsu). Absorbciju mēra pie 450 nm.

Izmērītā absorbcija ir proporcionāla attiecīgajā paraugā esošo antivielu titram. Antivielu titrus izsaka kā kalibrētāja attiecību %, un tos var iedalīt titru kategorijās (negatīvs, pelēkā zona, pozitīvs).

NODROŠINĀTIE REAĢENTI UN SAGATAVOŠANA

Reaģenti	Daudzums	Kods	Sagatavošana
Mikrotitrēšanas plate iepriekš pārklāta ar gangliozīdiem un HNK-1	2 x 12 x 8 iedobes sloksnes ar rāmi	B-GCM-MP	Gatavs lietošanai
Plašu hermētiķis	6 gabali		
Mazgāšanas buferšķīdums Koncentrāts (10x) ar konservantiem	2 pudeles x 100 mL	B-GCO-WB	Atšķaida ar 900 ml dejonizēta ūdens
Inkubācijas buferšķīdums ar konservantiem	1 pudele x 100 mL	B-GCO-IB	Gatavs lietošanai

Reaģenti	Daudzums	Kods	Sagatavošana
Kalibrators liofilizēts ar konservantiem	1 flakons	B-GCO-CA	Pievienojiet 1,5 mL inkubācijas buferšķīduma
Kontrole negatīvā, zemā un vidējā¹ liofilizēts ar konservantiem	3 flakoni	B-GCO-CONSET	Pievienojiet 1,5 mL inkubācijas buferšķīduma
Enzīmu marķieru IgG/IgM maisījums anti-cilvēka IgG un IgM antivielas, kas konjugētas ar HRP bufera matricā ar konservantiem	2 flakoni x 11 mL	B-GCO-ELGM	Gatavs lietošanai
Enzīma marķieris IgG anti-cilvēka IgG anti- viela, kas konjugēta ar HRP bufera matricā ar konservantiem	1 flakons x 11 mL	B-GCO-ELG	Gatavs lietošanai
Enzīma marķieris IgM anti-cilvēka IgM anti- viela, kas konjugēta ar HRP bufera matricā ar konservantiem	1 flakons x 11 mL	B-GCO-ELM	Gatavs lietošanai
TMB substrāts TMB citrāta buferšķīdumā	2 flakoni x 11 mL	B-TMB	Gatavs lietošanai
Stop šķīdums 0.25 M sērskābe	2 flakoni x 11 mL	B-STTS	Gatavs lietošanai Korozīvs līdzeklis

1. tabula

¹ Kontroles satur vairākus specifiskus anti-GM1 antivielu līmeņus. Skatiet papildu kvalitātes kontroles datu lapu, lai uzzinātu faktisko vidējo OD un % attiecību.

REAĢENTU UZGLABĀŠANA UN DERĪGUMA TERMIŅŠ

Atzīmogoti/neatvērti reaģenti	
Uzglabāt 2-8 °C temperatūrā. Neizmantojiet reaģentus pēc derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz etiķetēm.	
Atvērti/sagatavoti reaģenti	
Mikrotitrēšanas plate	Nekavējoties atlieciet atpakaļ neizmantotās joslas folijas maisiņā, kurā ir desikantu iepakojumi un atkārtoti aiztaisiet gar visu rāvējslēdzēja blīvējuma malu. Uzglabāt līdz 6 mēnešiem 2-8 °C temperatūrā.
Atšķaidīts mazgāšanas buferšķīdums	Uzglabāt līdz 6 mēnešiem 2-8 °C temperatūrā.
Inkubācijas buferšķīdums	
Enzīmu marķieri	
TMB substrāts	
Kalibrators	
Kontroles	
Stop šķīdums	Uzglabāt līdz 6 mēnešiem 18-28 °C temperatūrā.

2. tabula

NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NAV NODROŠINĀTI

- Mikropipetes ar vienreizlietojamiem uzgaļiem: 10 µL, 20 µL, 100 µL un 1000 µL pipetes
- Vienreizlietojamās polistirola vai polipropilēna mēģenes paraugu atšķaidījumu sagatavošanai
- 1000 mL cilindrs mazgāšanas buferšķīduma atšķaidīšanai

- Mikrotitrēšanas plašu mazgātājs
- Blotēšanas papīrs
- Mikrotitrēšanas plates kratītājs
- Mikrotitrēšanas plates lasītājs absorbcijas mērīšanai pie 450 nm

BRĪDINĀJUMI UN PIESARDZĪBAS PASĀKUMI

Drošības pasākumi

- Šī komplekta kalibrators un kontrolierīces satur cilvēka izcelsmes sastāvdaļas. Lai gan HBV, HCV un HIV1/2 testi ir negatīvi, ar reaģentiem jāīrkojas tā, it kā tie varētu pārnēsāt infekcijas, un ar tiem jāīrkojas saskaņā ar labu laboratorijas praksi (GLP), izmantojot atbilstošus piesardzības pasākumus.
- Šis komplekts satur sastāvdaļas, kas klasificētas saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1272/2008:
 - Stop šķīdums satur sērskābi (konc. 2,5 - 5%), tāpēc reaģenti var izraisīt ādas kairinājumu (H315), nopietnu acu kairinājumu (H319) un koroziju ar metāliem (H290).
 - Kalibrētājs, kontroles un enzīmu marķieri satur 2-metil-4-izotiazolin-3-ona hidrochlorīdu (koncentrācija $\geq 0,0015\%$), tāpēc reaģenti var izraisīt alerģiskas ādas reakcijas (H317).
 - Inkubācijas buferšķīdums un mazgāšanas buferšķīdums satur gentamicīna sulfātu, tāpēc reaģenti var izraisīt alerģisku ādas reakciju (H317).
- Izvairieties no reaģentu saskares ar ādu, acīm vai gļotādu. Ja notiek saskare, nekavējoties mazgāt ar lielu daudzumu ūdens, pretējā gadījumā var rasties kairinājums / apdegumi.
- Reaģenti un ķīmikālijas jāapstrādā kā bīstamie atkritumi saskaņā ar valsts bioloģiskās drošības vadlīnijām vai noteikumiem.

Tehniskie piesardzības pasākumi

- Pirms testa veikšanas rūpīgi izlasiet instrukcijas. Ja reaģenti tiek nepareizi atšķaidīti, modificēti vai uzglabāti apstākļos, kas nav aprakstīti šajā lietošanas instrukcijā, tas negatīvi ietekmē testa veikspēju.

ELISA procedūra

Reaģentu temperatūra

- Pirms analīzes procedūras sākšanas sagatavojiet reaģentus 3.-9. posmā izmantotajiem reaģentiem jābūt aukstiem (2-8 °C), un arī pipetēšanas un mazgāšanas laikā tiem jābūt aukstiem. Ieteikums: sagatavo mazgāšanas buferšķīdumu dienu pirms analīzes veikšanas un ievieto to ledusskapī uz nakti.
- Visus mazgāšanas soļus veikt ar aukstu (2-8 °C) mazgāšanas buferšķīdumu.
- Analīzes procedūras sākumā TMB substrātu un Stop šķīdumu uzsildīt līdz istabas temperatūrai (18-28 °C).

Mazgāšanas posmi

- 3., 6. un 9. mazgāšanas posms ir ļoti svarīgs, lai likvidētu ražošanas procesā radušās atliekas un/vai potenciāli nesaistītas antivielas iedobēs.
- Ieteicams izmantot automātisko mazgāšanas mašīnu, kas darbojas "plašu režīmā", t. i., katrs procesa posms

(dozēšana / aspirācija) tiek veikts visām sloksnēm secīgi, pirms instruments turpina nākamo mazgāšanas ciklu.

- Pārlicinieties, ka pēc pēdējā mazgāšanas cikla visas iedobes ir pilnīgi tukšas.

Substrāta inkubēšana

- 11. solis: inkubācijas laikā sakratiet mikrotitrēšanas plates ar substrātu. Atkarībā no plašu kratītāja modeļa ieteicams izvēlēties 400-600 apgriezienu minūtē. Šķīdumam ir jāpārvietojas iedobēs, bet tas nedrīkst pārplūst.

Komplekta sastāvdaļas

- Sastāvdaļas nedrīkst izmantot pēc derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz etiķetēm.
- Nesajaukt dažādas reaģentu partijas.
- Jānodrošina, lai starp reaģentiem, paraugiem vai iedobēm nenotiktu savstarpēja piesārņošana.
- Mikroiedobes nevar izmantot atkārtoti.

PARAUGU SAVĀKŠANA UN UZGLABĀŠANA

Procedūrai nepieciešams attiecīgi <0,1 mL asiņu vai <50 μ L seruma.

Nemiet asinis parastās venipunktūras mēģenēs bez jebkādam pledevām un izvairieties no hemolizes. Veikt seruma sagatavošanu saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Dekantējiet serumu.

Seruma paraugus var uzglabāt 2-8 °C temperatūrā līdz astoņām nedēļām, 28 °C temperatūrā līdz vienai nedēļai un ≤ -20 °C temperatūrā līdz 16 nedēļām. Sasaldēti paraugi pirms lietošanas jāatkausē un rūpīgi jāsamaisa, viegli pagriežot vai apgriežot.

Pirms sasaldēšanas ieteicams sagatavot seruma paraugu alikvotas, lai izvairītos no atkārtotiem sasaldēšanas/atkausēšanas cikliem.

TESTĒŠANAS PROCEDŪRA

Ir divas iespējas:

- (1) Jauktu izotipu (IgG un IgM) noteikšana: 7. solī pievienojiet enzīma marķieru maisījumu.
- (2) IgG vai IgM izotipu noteikšana: 7. solī pievienot vai nu enzīma marķieri IgG vai enzīma marķieri IgM.

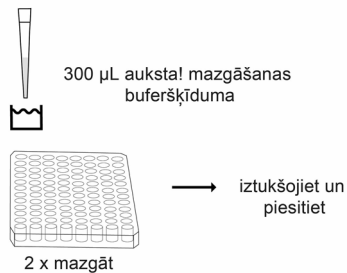
Piezīme: TMB substrāta šķīdumu uzsildīt līdz istabas temperatūrai (18-28 °C).

1. Atšķaidiet paraugus 1:50 ar inkubācijas buferšķīdumu. Izmantojiet, piemēram, 20 μ L seruma + 980 μ L auksta! (2-8 °C) inkubācijas buferšķīdumu. Rūpīgi sajauciet (sakratot) un pirms pipetēšanas atstājiet atšķaidītos paraugus, kā arī sagatavoto kalibratoru un kontroles 30 minūtes 2-8 °C temperatūrā (skatīt 4.a un 4.b soli).
2. Sagatavojiet plates rāmi ar pietiekamu joslu skaitu, lai testētu vajadzīgo skaitu kalibratoru, kontroļu un paraugu. Noņemiet liekās joslas no rāmīša un nekavējoties ievietojiet to atpakaļ folijas maisiņā kopā ar desikanta iepakojumiem. Uzglabāt ledusskapī.

Piezīme: 3.-9. posmā izmantojiet aukstus reaģentus.

3. Izskalojiet iedobes divas reizes, izmantojot vismaz 300 μ L auksta! (2-8 °C) skalošanas buferšķīduma uz

iedobi. Iztukšojiet iedobes un stingri piesitiet plāksnīti pie blotinga papīra, lai pilnībā noņemtu atlikušo šķidrumu.



Piezīme: nekavējoties pārejiet uz nākamajiem soļiem.

4a. Ar pipeti iepiliniet 100 µL kalibratora iedobē A1 (skatīt 1.A attēlu 1. variantam vai 1.B attēlu 2. variantam).

4b. Ar pipeti iepiliniet 100 µL vidējas kontroles parauga B1 iedobē, zemas kontroles parauga A2 iedobē un negatīvas kontroles parauga B2 iedobē (sk. 1A vai 1B attēlu).

Piezīme 1. variantam: Ja vienā piegājienā izmanto vairāk nekā trīs joslas, kalibrētāju un kontroles var testēt dubultā (sk. 1.A attēlu).

Piezīme 2. variantam: IgG un IgM izotipiem kalibrētājs un kontrole jāveic atsevišķi (skatīt 1.B attēlu).

4c. Ar pipeti iepiliniet 100 µL atšķaidīta 1. parauga iedobēs C1-H1 (skatīt 1.A vai 1.B attēlu).

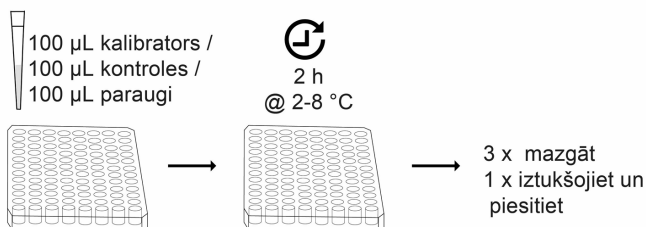
4d. Ar pipeti iepiliniet 100 µL atšķaidīta 2. parauga iedobēs C2-H2 (skatīt 1.A vai 1.B attēlu).

4e. Ar pipeti iepiliniet 100 µL atšķaidītu paraugu 3-24 (1. variantam) vai 3-12 (2. variantam) nākamajās iedobēs (sk. 1.A vai 1.B attēlu).

Piezīme 2. variantam: atkārtojiet 1.-12. parauga pipetēšanu tādā pašā secībā atlikušajās iedobēs, lai veiktu testēšanu ar otro izotipu.

5. Pārklājiet plati ar plākšņu hermētiķi un inkubējiet 2 stundas (± 5 min) 2-8 °C temperatūrā (plate nedrīkst kratīt).

6. Noņemiet plātes hermētiķi. Iztukšojiet iedobes un mazgājiet trīs reizes, izmantojot vismaz 300 µL auksta! (2-8 °C) skalošanas buferšķidruma uz iedobi. Iztukšojiet iedobes un stingri piesitiet plāksni pie blotēšanas papīra, lai pilnībā noņemtu mazgāšanas buferšķidrumu.



Iespēja Nr. 1: jaukta izotipa noteikšana

7. Pievienojiet iedobēs 100 µL maisījuma.

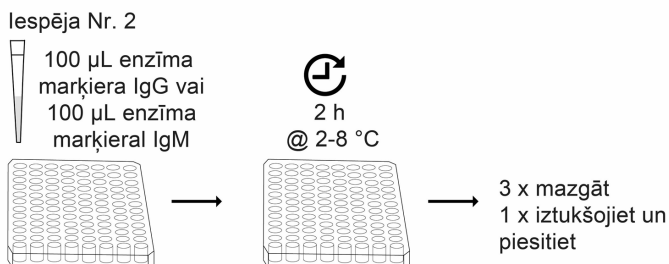
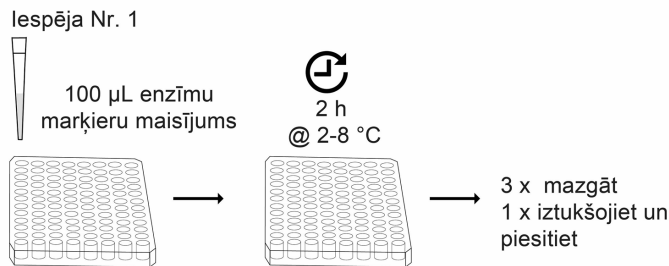
Iespēja Nr. 2: IgG vai IgM izotipu noteikšana

7'. Attiecīgajās iedobēs pievieno 100 µL vai nu ar enzīmu marķieri IgG, vai IgM (sk. 1.B attēlu).

8. Pārklājiet plati ar plātes hermētiķi un inkubējiet 2 stundas (± 5 min) 2-8 °C temperatūrā (plati nedrīkst kratīt).

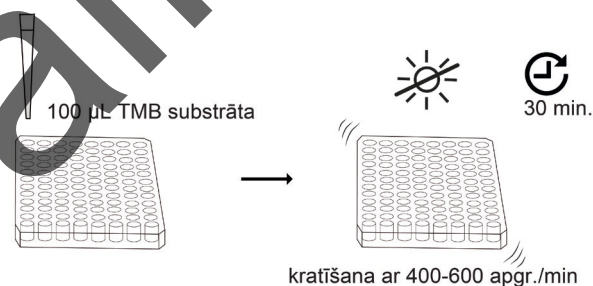
9. Noņemiet plātes hermētiķi. Iztukšojiet iedobes un mazgājiet trīs reizes, izmantojot vismaz 300 µL auksta!

(2-8 °C) skalošanas buferšķidruma uz iedobi. Iztukšojiet iedobes un stingri piesitiet plāksnīti pie blotēšanas papīra.



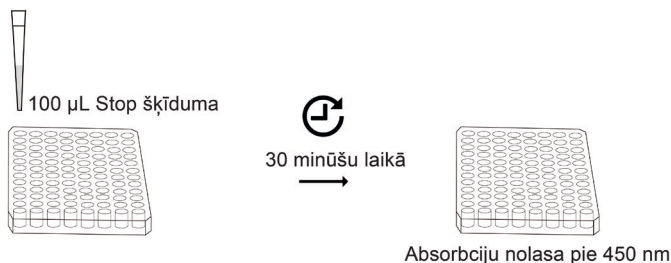
10. Katrā iedobē pievieno 100 µL TMB substrāta šķidruma (uzslidīts līdz istabas temperatūrai).

11. Plati pārklājiet ar plātes hermētiķi, pasargājiet plati no gaishmas un inkubējiet uz plātes kratītāja ar 400-600 apgriezieniem minūtē 18-28 °C temperatūrā 30 \pm 2 minūtes.



12. Visās iedobēs pievieno 100 µL Stop šķidruma. Noņemiet gaisa burbuļus ar pipetes uzgali. Pārejiet uz 13. posmu 30 minūšu laikā.

13. Mikrotitrēšanas plātes lasītājā nolasi absorbciju pie 450 nm.



KVALITĀTES KONTROLE

Šīs lietošanas instrukcijas rūpīga izpratne ir nepieciešama, lai veiksmīgi lietotu produktu. Uzticamus rezultātus var iegūt tikai tad, ja tiek izmantotas precīzas laboratorijas metodes un precīzi ievērota šī lietošanas instrukcija.

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA komplektam ir trīs kontroles: negatīvā, zemā un vidējā kontrole. Kontrolēm ir piešķirti vērtību diapazoni (% attiecība), kas norādīti katram komplektam pievienotajā kvalitātes kontroles datu lapā. Lai

Iegūtu derīgus rezultātus, kontroles mērījumiem ir jāatbilst norādītajiem vērtību diapazoniem. Papildus komplekta kontrolēm iekšējai kvalitātes kontrolei mēs iesakām izmantot seruma kopas.

Kalibrētājam ieteicamā minimālā OD_{450nm} vērtība ir 1,2. Veiktspējas raksturlielumiem jābūt noteiktajās robežās. Ja analīzes veiktspēja neatbilst noteiktajām robežām un atkārtošana izslēdz tehnikas kļūdas, pārbaudiet šādus parametrus: i) temperatūras kontroli (3.-9. posmā izmantotie reaģenti tiek turēti 2-8 °C temperatūrā), ii) termometru, pipetēšanas un laika mērīšanas ierīču precizitāti, iii) ELISA lasītāja iestatījumus, iv) reaģentu derīguma termiņus, v) glabāšanas un inkubācijas apstākļus, vi) TMB substrāta šķīduma krāsu (jābūt bezkrāsainam), vii) ūdens tīrību, viii) aspirācijas un mazgāšanas metodes.

STANDARTIZĀCIJA UN METROLOĢISKĀ IZSEKOJAMĪBA

Nav starptautiski vai nacionāli atzītu references materiālu vai references mērīšanas procedūru antigangliozīda vai -MAG antivielu noteikšanai seruma paraugos. BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA ir standartizēts attiecībā pret iekšēji noteiktu references materiālu. Kalibrēšanas vērtības tiek piešķirtas saskaņā ar vērtību pārnesei protokolā (2. atsauce), lai garantētu metroloģisko izsekojamību, un ir norādītas patvaļīgās "% attiecības" vienībās.

Tika noteikts, ka produktu kalibratoru kombinētās nenoteiktības 95% ticamības intervāls ir 29,3% IgG antivielām un 37,6% IgM antivielām.

TESTA REZULTĀTU APRĒĶINS

- Reģistrējiet absorbciju (OD) pie 450 nm katrai iedobei (kalibratoram, kontrolēm un paraugiem).
- Ja ir veikti vairāki kalibrēšanas un kontroles mērījumi, aprēķiniet vidējās vērtības.

Rezultāti ir izteikti kā paraugu absorbcijas un kalibrētāja (vidējās) absorbcijas attiecība.

Izotipu maisījums

paraugu vai kontroles absorbcija

$$\% \text{ attiecība: } \frac{\text{paraugu vai kontroles absorbcija}}{\text{kalibratora absorbcija}} \times 200$$

IgG un IgM izotipi

paraugu vai kontroles absorbcija

$$\% \text{ attiecība: } \frac{\text{paraugu vai kontroles absorbcija}}{\text{kalibratora absorbcija}} \times 100$$

Lielākajai daļai mikroplašu lasītāju ir pieejamas programmas rezultātu aprēķināšanai kā % attiecību.

Piezīme: 7. un 8. tabulā sniegtie rezultāti ir piemēri, un tie sniegti tikai demonstratīviem nolūkiem.

IEROBEŽOJUMI

- Augsts % attiecība (> 100%) atsevišķiem gangliozīdiem var izraisīt savstarpēju reaktivitāti ar citiem gangliozīdiem tajā pašā paraugā. Krusteniskā reaktivitāte parasti uzrāda lielas variācijas starp analīzēm. Tādēļ rezultātu interpretācija jāveic tikai kopā ar ekspertu/speciālistu.
- Nemot vērā autoimūno antivielu polireaktivitāti un ģeogrāfiskās izplatības atšķirības, analīžu rezultāti jāizmanto tikai kā atbalsts neiropātijas klīniskai

interpretācijai, ko veic eksperts/speciālists kopā ar pacienta klīnisko ainu (3. atsauce).

- Šis tests nav apstiprināts plazmaferēzei.
- Intravenozi ievadīti imūnglobulīni (IVIg) var ietekmēt testa rezultātus.

ATSAUCES INTERVĀLI UN ROBEŽVĒRTĪBAS

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA atsaucis intervāls tika noteikts saskaņā ar CLSI C28-A3, izmantojot 120 seruma paraugus, kas iegūti no cilvēkiem, kas sevi atzinuši par veselīgiem. Antigangliozīdu un anti-MAG- antivielas normāliem asins donoriem tika klasificētas titru kategorijās: negatīvs (<30% attiecība), pelēkā zona (30-50% attiecība) un pozitīva (>50% attiecība). Rezultāti ir apkopoti 9. tabulā. Pozitīvā testa robežvērtība ir 50 % attiecība.

REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Antigēns	IgG/IgM maisījums		
	Vērtības (% attiecība)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Negatīvs	Skatīt anotāciju */**	Skatīt anotāciju */**
GM1		Atkārtot testu vēlāk	Pozitīvs
GT1a			
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

3. tabula

Antigēns	IgG		
	Vērtības (% attiecība)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Negatīvs	Skatīt anotāciju *	Skatīt anotāciju *
GM1		Atkārtot testu vēlāk	Pozitīvs
GT1a			
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

4. tabula

Antigēns	IgM		
	Vērtības (% attiecība)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Negatīvs	Skatīt anotāciju **	Pozitīvs (skatīt anotāciju **)
GM1		Atkārtot testu vēlāk	Pozitīvs
GT1a			
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

5. tabula

Testa rezultāti jāinterpretē kopā ar informāciju, kas iegūta, veicot pacienta klīnisko novērtējumu un citas diagnostikas procedūras.

* MAG neiropātija parasti ir saistīta ar IgM izotipa anti-MAG antivielu klātbūtni (4. atsauce).

** HNK-1 rezultātus starp 30 un 50% (pelēkā zona) vai > 50% (pozitīvi), kas iegūti ar maisījumu vai enzīma marķieri IgM, var atkārtoti pārbaudīt ar anti-MAG Antibodies ELISA (EK-MAG).

VEIKTSPĒJAS RAKSTUROJUMS

Metožu salīdzinājums

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA salīdzinājumā ar anti-MAG Antibodies ELISA

Metožu salīdzināšanas pētījums tika veikts saskaņā ar CLSI vadlīnijām EP09-A3 un EP12-A2. Izmantojot 2 partijas BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA un 2 partijas anti-MAG Antibodies ELISA, tika izmērīti simts divdesmit divi (122) paraugi. Tika noteikta diagnostiskā (kappa) atbilstība, negatīvā procentuālā atbilstība un pozitīvā procentuālā atbilstība. Atbilstības ir atspoguļotas 10. tabulā.

Precizitāte laboratorijas ietvaros

Antigangliozīdiem: 5,7 - 13,2% CV

Anti-MAG: 14,4 – 36,5% CV

Precizitāte laboratorijas ietvaros tika noteikta saskaņā ar CLSI vadlīnijām EP05-A3, izmantojot standartizētu 20 dienas x 2 mēģinājumi x 2 atkārtējumi pētījuma plānu. Tika testēti trīs (3) apvienoti pacientu seruma paraugi. Rezultāti apkopoti 11. tabulā.

Atkārtotamība

Antigangliozīdiem: 7,7 – 19,1% CV

Anti-MAG: 23,5 – 33,2% CV

Reproducējamība tika noteikta saskaņā ar CLSI vadlīnijām EP05-A3, izmantojot pētījuma plānu 3 instrumenti/partijas/operators x 5 dienas x 5 atkārtējumi. Tika testēti trīs (3) apvienoti pacientu seruma paraugi. Rezultāti apkopoti 12. tabulā.

Tukšā satura robeža (LoB) ≤ noteikšanas robeža (LoD): ≤30% attiecība

LoB un LoD tika noteikti saskaņā ar CLSI vadlīniju EP17-A2, izmantojot neparametrisko analīzi. Rezultāti apkopoti 13. tabulā.

Augstas devas āķa efekts

Mērījumu diapazonā netika novērots ierobežojums, ko radītu augstas devas āķa efekts.

Savstarpējā reaktivitāte

Paraugiem, kas ņemti no pacientiem ar dažādām autoimūnām slimībām (14. tabula) un pacientiem ar citiem neiroloģiskiem traucējumiem (15. tabula), netika novērota sistemātiska savstarpēja reaktivitāte.

KLĪNISKAS SNIEGUMS

Klīniskā snieguma novērtējums tika veikts, apkopojot recenzētas zinātniskās literatūras analīzi. Sešos (6) pētījumos tika aplūkota BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA klīniskā veikspēja autoimūno perifēro neiropātiju diagnostikā (sk. 5-10). Analīzes rezultāti un sīkāka informācija par pētījumiem ir sniegta attiecīgi 6. tabulā un 16. tabulā.

N perifērā neiropātija	201 (102 bērnu GBS, 14 CIDP, 44 GBS, 41 anti-MAG neiropātija)
N kontroles	493 (104 DC, 254 NC, 135 HC)
Juīgums (95% CI)	68,1% (39,6 – 87,5%)
Specifiskums (95% CI)	88,0% (72,3 – 95,3%)
ROC AUC	0,85

6. tabula

GBS, Guillain-Barré sindroms; DC, ne neiroloģiska slimības kontrole; NC, neiroloģiska kontrole; HC, veselīga kontrole; CIDP, hroniska iekaisuma demielinizējoša polineuropātija; CI, ticamības intervāls; ROC AUC, laukums zem uztverēja darbības raksturlīknes.

INTERFERĒJOŠĀS VIELAS

Saskaņā ar CLSI vadlīniju EP07-A3 tika novērtēta testa jutība pret orāli lietojamiem un injicējamiem farmaceitiskiem līdzekļiem, kā arī pret endogēnām vielām. Rezultātu novirze $\geq \pm 20\%$ attiecība tika uzskatīta par interferenci.

Netika konstatēti interferences ar šādām vielām līdz norādītajām koncentrācijām: intravenozi imūnglobulīns (20 mg/mL), rituksimabs (3 mg/mL), kladribīns (273 ng/mL), interferons alfa-2a (49,5 ng/mL), gabapentīns (26,7 µg/mL), ibuprofēns (0,22 mg/mL), hlorambucils (1,96 µg/mL), prednizons (99 ng/mL), prednizolons (1,2 µg/mL), reimatoīdais faktors (2340 IU/mL), hemoglobīns (10 mg/mL), hemolīšāts (10 mg/mL), triglicerīdi (15 mg/mL), konjugētais bilirubīns (20 µg/mL), nekonjugētais bilirubīns (150 µg/mL).

TABULAS UN ATTĒLI

Mikrotitrēšanas plates sagatavošana: IgG/IgM maisījuma marķieris

		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

1A attēls: ≤ 24 serumi / komplekts (2 MP / komplekts)

Mikrotitrēšanas plates sagatavošana: IgG un IgM marķieri

		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

1B attēls: 2 profili / serums, ≤ 12 serumu / komplekts (2 MP / komplekts)

Rezultātu piemērs

A IgG/IgM maisījuma marķieris

B-GCO-ELGM	Absorbciņa (OD450)	Attiecība [%]
Kalibrators	2,179 2,477	
Kalibrators vidējā vērtība	2,328	100
Vidējā kontrole	1,737	
Vidēja kontrole vidējā vērtība	1,891 1,814	78
Zemā kontrole	0,662	
Zemā kontrole vidējā vērtība	0,460 0,561	24
Negatīvā kontrole	0,044	
Negatīvā kontrole vidējā vērtība	0,046 0,045	2
1 paraugs HNK-1	0,234	10
1 paraugs GM1	0,543	23
1 paraugs GT1a	1,976	85
1 paraugs GD1a	0,621	27
1 paraugs GD1b	0,734	32
1 paraugs GQ1b	2,573	111

7. tabula

B IgG un IgM marķieri

Enzīmu marķieris	Absorbciņa (OD450)		Attiecība [%]	
	IgG	IgM	IgG	IgM
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM				
Kalibrators	2,488 2,446	2,411 2,201		
Kalibrators vidējā vērtība	2,467	2,306	100	100
Vidējā kontrole	1,879	1,734		
Vidēja kontrole vidējā vērtība	1,987 1,933	1,818 1,776	78	77
Zemā kontrole	0,452	0,501		
Zemā kontrole vidējā vērtība	0,716 0,584	0,609 0,555	24	24
Negatīvā kontrole	0,045	0,048		
Negatīvā kontrole vidējā vērtība	0,037 0,041	0,042 0,045	2	2
1 paraugs HNK-1	0,423	0,621	17	27
1 paraugs GM1	2,001	2,102	81	91
1 paraugs GT1a	0,521	0,237	21	10
1 paraugs GD1a	1,984	0,821	80	36
1 paraugs GD1b	0,473	1,923	19	83
1 paraugs GQ1b	0,094	0,911	4	40

8. tabula

TABULAS UN ATTĒLI

Atsauces intervāls

Analizējamā viela	% normālu asins donoru kategorijās			Atsauces robežvērtība (90% CI)
	<30 %	30 - 50 %	>50 %	
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 sievietes apakšgrupa. M vīriešu apakšgrupa

9. tabula

Anti-MAG antivielu metožu salīdzinājums

Apraksts	N	Kappa atbilstība		NPA		PPA	
		Vērtība	95% CI	Vērtība	95% CI	Vērtība	95% CI
EK-GCM IgM pret 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 pret EK-MAG	122	0,87	0,78 - 0,96	97,0%	89,5% - 99,6%	89,3%	78,1% - 96,0%

10. tabula

NPA: Negatīvā procentuālā atbilstība

PPA: Pozitīvā procentuālā atbilstība

CI: Uzticamības intervāls

Precizitāte laboratorijas ietvaros

Parauga apraksts			Precizitāte laboratorijas ietvaros			
Analizējamā viela	Enzīma marķieris (izotips)	Paredzamā kategorija [% attiecība]	N	Vidējais [% attiecība]	SD [% attiecība]	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

11. tabula

Atkārtojamība

Parauga apraksts			Atkārtojamība			
Analizējamā viela	Enzīma marķieris (izotips)	Paredzamā kategorija [% attiecība]	N	Vidējais [% attiecība]	SD [% attiecība]	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

12. tabula

LoD un LoB

Analizējamā viela	LoB [% attiecība]	LoD [% attiecība]
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

13. tabula

Savstarpējā reaktivitāte

Norādītā anti-viela	Diagnoze	#
Anti-neitrofilu citoplazmas antivielas (ANCA)	Vaskulīts	3
	Citi (ANCA pozitīvi paraugi)	10
	Sistēmiskā sarkanā vilkēde	5
Anti-nukleārās antivielas (ANA)	Reimatoīdais artrīts	9
	Sjorgena sindroms	6
	Citi (ANCA pozitīvi paraugi)	3
	Anti-tiroglobulīna antivielas (anti-Tg)	Autoimūnais tiroidīts
Anti-ribonukleoproteīna antivielas	Jaukta saistaudu slimība	1
Anti-GQ1b, anti-GM1, anti-GD1b	Autoimūnā perifērā neiropatija	1
Anti-acetil-holīns receptoru antivielas un pret muskuļiem specifiska tirozīnkināze	Myasthenia gravis	7

14. tabula

Perifēriskās neiropatijas	#
Alkoholiskais	1
Diabēta	5
Perifēro neiropatiju imitējoši traucējumi	#
Amiotrofiskā laterālā skleroze (ALS)	15
Sarkoidoze	4
Valdenštroma makroglobulinēmija (WM)	4
Čagasa slimība	5

15. tabula

TABULAS UN ATTĒLI

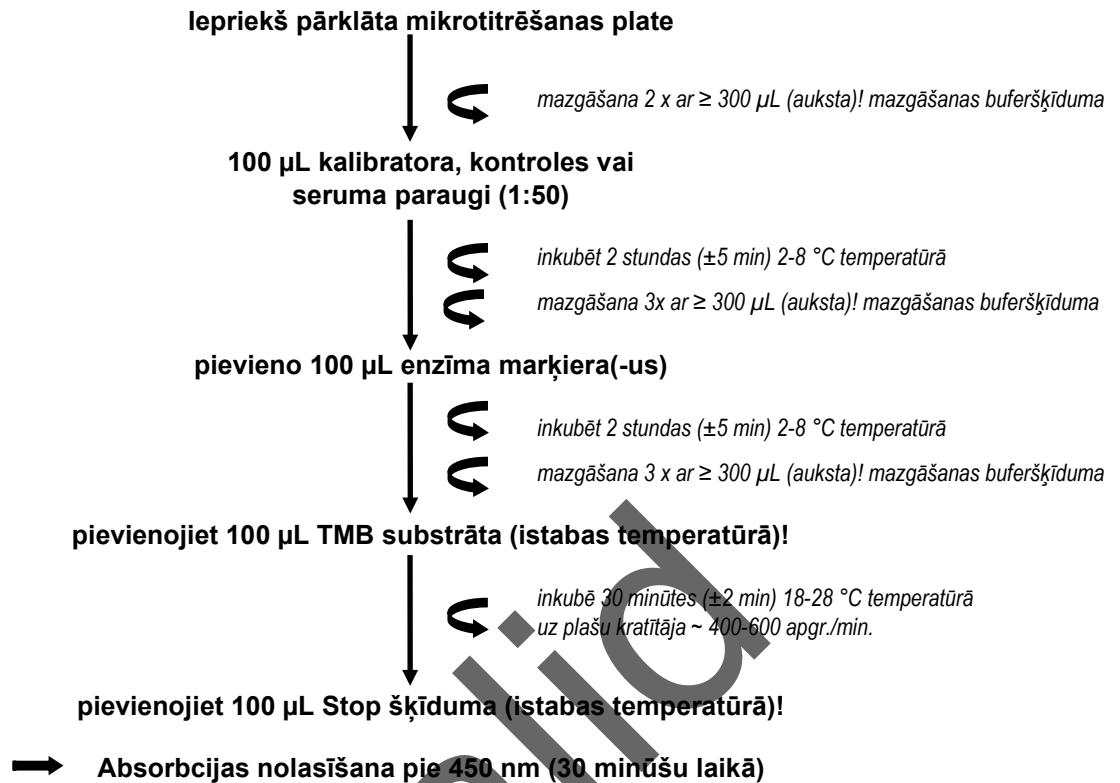
Klīniskais sniegums

Pētījums	Pozitīvās kontroles (gadījumi)	Negatīvās kontroles	Epitops	Sensitivitāte	Specifiskums
Hashemilar u.c., 2014	Pediatrijas GBS (n = 45)	DC (n = 35)	GM1	0,51	0,89
			GQ1b	0,56	0,74
Sharma u.c., 2011	Pediatrijas GBS (n = 57)	NC (n = 42)	GM1	0,82	0,33
		DC (n = 35)			0,83
Khandelwal u.c., 2006	GBS (n = 13)	HC (n = 19)	GM1	0,31	0,74
Uetz-von Allmen u.c., 1998	GBS, CIDP (n = 19, 14)	NC (n = 100)	GM1	0,30	0,93
		HC (n = 110)			0,95
Spatola u.c., 2016	GBS (MFS) (n = 12)	DC (n = 34)	GQ1b	0,92	0,97
Delmont u.c., 2019	MAG-neiropātija (n = 41)	NC (n = 112) HC (n = 6)	HNK-1 (MAG)	0,98	0,99

16. tabula

GBS - Gijēna-Barē sindroms; DC - ne neiroloģiska slimības kontrole; NC - neiroloģiska kontrole; HC - veselīga kontrole; MFS - Millera-Fišera sindroms; CIDP - hroniska iekaisuma demielinizējoša polineuropātija.

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA



LAIKS LĪDZ REZULTĀTIEM: 4,5 STUNDAS

ATSAUCES

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).

IZMAIŅU ŽURNĀLS

Datums	Versija	Izmaiņas
2023-08-17	A1	<p>Lietošanas <i>Paredzētais lietojums</i> un produkta nosaukuma izmaiņas GM2 gangliozīda izņemšana un GT1a gangliozīda ieviešana. <i>Pārbaudes princips</i> pārformulējums ar titru kategorijām: negatīvs, pelēkā zona, pozitīvs Reaģentu jaunas lietošanas stabilitātes Nodaļas <i>Brīdinājumi un piesardzības pasākumi</i> atjauninājums Pārskatītas nodaļas <i>Paraugu savākšana un uzglabāšana, Testēšanas procedūra un Standartizācija un metroloģiskā izsekojamība.</i> Nodaļas <i>Kvalitātes kontrole</i> pārformulējums Nodaļas <i>Ierobežojumi</i> atjaunināšana Pārskatītas nodaļas <i>Atsauces intervāli un robežvērtības, Veiktspējas raksturojums un Interferējošās vielas.</i> Nodaļas <i>Klīniskais sniegums</i> iekļaušana Nodaļu <i>Atsauces un Simboli</i> pārskatīšana Paziņotās struktūras numura pievienošana CE zīmei - atbilstības novērtēšanas procedūra saskaņā ar IVDR 2017/746</p>

ZIŅOŠANA PAR INCIDENTIEM ES DALĪBVALSTĪS

Ja ir noticis kāds nopietns incidents saistībā ar šo ierīci, lūdzu, nekavējoties ziņojiet ražotājam un savas dalībvalsts kompetentajai iestādei.

PIEGĀDES BOJĀJUMI

Lūdzu, informējiet savu izplatītāju, ja šī prece tika saņemta bojāta.

SIMBOLI

BÜHLMANN izmanto simbolus un zīmes, kas uzskaitīti un aprakstīti ISO 15223-1. Papildus tiek izmantoti šādi simboli un zīmes:

Simbols	Skaidrojums
MP	Mikrotitrēšanas plate
BUF WASH 10X	Mazgāšanas bufera koncentrāts (10x)
BUF INC	Inkubācijas buferis
CAL	Kalibrators
CONTROL -	Kontrole - negatīvs
CONTROL L	Kontrole - zems
CONTROL M	Kontrole - vidējs
EL IgG	Enzīma marķieris IgG
EL IgM	Enzīma marķieris IgM
EL MIX	Enzīma marķieris IgG/IgM Mix
SUBS TMB	TMB substrāts
SOLN STOP	Stop šķīdums

