



BÜHLMANN GanglioCombi[®] MAG ELISA

with enzyme labels IgG/IgM Mix, IgG and IgM

Detection of anti-ganglioside
and -MAG antibodies by ELISA
(HNK-1 ("MAG"), GM1, GT1a, GD1a, GD1b and GQ1b)

za *in vitro* dijagnostičku upotrebu

EK-GCM 2 x 96 tests

Datum izdavanja: 2023-08-17
Verzija A1

 **Proizvođač**

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

NAMENA

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA je in vitro dijagnostički test za semikvantitativno određivanje IgG i/ili IgM antitela na odabrane neuralne antigene/epitope u uzorcima seruma. Rezultati testa se mogu koristiti kao podrška dijagnozi autoimunih perifernih neuropatija u kombinaciji sa drugim kliničkim i laboratorijskim nalazima. Samo za laboratorijsku upotrebu.

NAMENJENA PRIMENA

Tri enzimska obeleživača, obezbeđena u kitu omogućavaju testiranje po tri različita algoritma:

1. Testiranje sa IgG/IgM konjugat mixom (u daljem tekstu mix) omogućava screening na prisustvo anti-neuralnih antitela koja ukazuju na autoimunu neuropatiju
2. Testiranje sa pojedinačnim IgG i/ili IgM konjugatima omogućava određivanje izotipa antitela.
3. Za laboratorijsku obradu, inicijalni screening uzorka upotrebom mixa (opcija 1), može biti praćen diferencijacijom mix-pozitivnih uzoraka upotrebom pojedinačnih IgG i IgM konjugata (opcija 2), ako je potrebno.

PRINCIP TESTA

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA omogućava merenje antitela na gangliozid i antitela na glikoprotein povezanog sa mijelinom (MAG) u serumu. Mikrotitar ploča je obložena gangliozidima: GM1, GT1a, GD1a, GD1b, GQ1b i hemijski sintetisanim HNK-1 epitopom MAG glikoproteina (ref. 1).

Serumi pacijenata, kontrole i kalibrator se dodaju u udubljenja mikrotitar ploče. Posle 2 sata inkubacije na 2 – 8°C i koraka ispiranja, antitela za detekciju (anti-IgG/IgM, anti-IgG, anti-IgM) konjuguju se sa peroksidazom rena (HRP) detektuju anti-gangliozidna i/ili anti-MAG antitela vezana za imobilizovane gangliozide ili HNK-1 na ploči. Posle još 2 sata inkubacije i daljih koraka ispiranja, dodaje se hromogeni HRP supstrat, tetrametilbenzidin (TMB) (formiranje plave boje), a zatim se reakcija zaustavlja (promena u žutu boju). Apsorbanca se meri na 450 nm.

Izmerena apsorbanca je proporcionalna titru antitela prisutnih u datom uzorku. Titri antitela se izražavaju kao % Odnosa kalibratora i mogu se dodeliti kategorijama titra (negativna, siva zona, pozitivna).

OBEZBEĐENI REAGENSI I PRIPREMA

Reagensi	Količina	Kod	Rekonstitucija
Mikrotitar ploča obložena gangliozidima i HNK-1	2 x 12 stripova x 8 udubljenja, u ramu	B-GCM-MP	Spremna za upotrebu
Folija za ploču	6 komada		
Koncentrat pufera za ispiranje (10x) Sa konzervansima	2 boce x 100 mL	B-GCO-WB	Razblažiti sa 900 mL dejonizovane vode
Pufer za inkubaciju Sa konzervansima	1 boca x 100 mL	B-GCO-IB	Spremna za upotrebu

Reagensi	Količina	Kod	Rekonstitucija
Calibrator Liofilizat sa konzervansima	1 bočica	B-GCO-CA	Dodati 1,5 mL Pufera za inkubaciju
Kontrola negativna, niska i srednja¹ Liofilizat sa konzervansima	3 bočice	B-GCO-CONSET	Dodati 1,5 mL Pufera za inkubaciju
IgG/IgM Mix obeležen enzimom Anti-humana IgG i IgM antitela konjugovana sa HRP-om u puferskom matriksu sa konzervansima	2 bočice x 11 mL	B-GCO-ELGM	Spremna za upotrebu
IgG obeležen enzimom Anti-humano IgG antitelo konjugovano sa HRP-om u puferskom matriksu sa konzervansima	1 bočica x 11 mL	B-GCO-ELG	Spremna za upotrebu
IgM obeležen enzimom anti-humano IgM antitelo konjugovano sa HRP-om u puferskom matriksu sa konzervansima	1 bočica x 11 mL	B-GCO-ELM	Spremna za upotrebu
TMB supstrat TMB u citratnom puferu	2 bočice x 11 mL	B-TMB	Spremna za upotrebu
Rastvor za zaustavljanje reakcije 0.25 M sumporna kiselina	2 bočice x 11 mL	B-ST5	Spremna za upotrebu Korozivan agens

Tabela 1

¹ Kontrole sadrže anti-GM1 antitela specifična za lot. Za tačnu srednju vrednost OD i % Odnosa pogledati QC list sa podacima.

ČUVANJE I ROK UPOTREBE REAGENASA

Zatvoreni / neotvoreni reagensi	
Čuvati na 2-8 °C. Ne koristiti reagense nakon isteka roka upotrebe datog na nalepicama.	
Otvoreni / Rekonstituisani reagensi	
Mikrotitar ploča	Stripove koji se neće koristiti vratiti odmah u kesicu zajedno sa desikantom i ponovo zatvoriti celom dužinom zip zatvarača. Čuvati do 6 meseci na 2-8 °C.
Razblaženi pufer za ispiranje	Čuvati do 6 meseci na 2-8 °C.
Pufer za inkubaciju	
Enzimski obeleživač	
Supstrat TMB	
Kalibrator	
Kontrole	
Rastvor za zaustavljanje reakcije	Čuvati do 6 meseci na 18-28 °C.

Tabela 2

MATERIJALI KOJI SU POTREBNI I NISU OBEZBEĐENI

- Precizne pipete sa nastavcima za jednokratnu upotrebu: pipete od 10 µL, 20 µL, 100 µL i 1000 µL
- Polistirenske ili polipropilenske epruvete za jednokratnu upotrebu za pripremu razblaženja uzoraka
- Erlenmajer od 1000 mL za razblaživanje pufera za ispiranje

- Ispirač za mikrotitar ploče
- Apsorbujući papir
- Šejker za mikrotitar ploče
- Čitač za mikrotitar ploče za merenje apsorbance na 450 nm

UPOZORENJA I PREDOSTROŽNOSTI

Bezbednosne predostrožnosti

- Kalibrator i kontrole ovog kita sadrže komponente humanog porekla. Iako su testirani i bili negativni na HBV, HCV i HIV1/2, reagensima treba rukovati kao da su izvor infektivnih agenasa i njima treba rukovati u skladu sa smernicama Dobre laboratorijske prakse (DLP) primenom odgovarajućih mera predostrožnosti.
- Kit sadrži komponente klasifikovane u skladu sa Regulation (EC) No. 1272/2008:
 - Rastvor za zaustavljanje reakcije sadrži sumpornu kiselinu (konc. 2,5 – 5%), stoga ovaj reagens može izazvati iritaciju kože (H315), ozbiljnu iritaciju oka (H319) i može biti korozivan za metale (H290).
 - Kalibrator, kontrole i enzimski obeleživač sadrže 2-metil-4-izotiazolin-3-on hidrohlorid (konc. $\geq 0,0015\%$) i stoga mogu uzrokovati alergijske reakcije kože (H317).
 - Pufer za inkubaciju i pufer za ispiranje sadrže gentamicin sulfat i stoga mogu uzrokovati alergijske reakcije kože (H317).
- Sprečiti kontakt reagensa sa kožom, očima ili sluzokožom. Ako dođe do kontakta, odmah isprati velikom količinom vode; u suprotnom može doći do iritacije/opekotina.
- Reagensi i hemikalije se moraju tretirati kao opasan otpad u skladu sa nacionalnim smernicama ili propisima o bezbednosti od bioloških opasnosti.

Tehničke predostrožnosti

- Pažljivo pročitati uputstvo pre izvođenja testa. Na performanse testa će negativno uticati ako se reagensi pogrešno razblaže, modifikuju ili čuvaju u uslovima drugačijim od onih opisanih u ovom uputstvu za upotrebu.

ELISA procedura

Temperatura reagenasa

- Pripremiti reagense pre početka postupka analize. Koraci 3-9: Reagensi koji se koriste u koracima 3-9 moraju biti hladni (2-8 °C) i moraju se držati na hladnom tokom pipetiranja i ispiranja. Preporuka: Pripremiti pufer za ispiranje dan pre izvođenja testa i staviti ga u frižider preko noći.
- Obaviti sve korake ispiranja hladnim (2-8 °C) puferom za pranje.
- Omogućiti da TMB supstrat i rastvor za zaustavljanje reakcije dostignu sobnu temperaturu (18-28 °C) na početku postupka analize.

Koraci ispiranja

- Koraci ispiranja 3, 6 i 9 su ključni za uklanjanje ostataka nastalih u procesu proizvodnje i/ili potencijalno nevezanih antitela u udubljenjima.

- Strogo se preporučuje upotreba uređaja za automatsko za ispiranje koji radi u režimu „plate mode“, tj. svaki korak procesa (doziranje/aspiracija) se izvodi na svim stripovima, uzastopno, pre nego što instrument nastavi sa sledećim ciklusom ispiranja.
- Proveriti da li su sva udubljenja potpuno prazna nakon poslednjeg ciklusa ispiranja.

Inkubacija supstrata

- Korak 11: Protresti mikrotitar ploču tokom inkubacije sa supstratom. U zavisnosti od modela šejkera za ploče preporučujemo 400-600 o/min. Rastvor treba da se kreće u udubljenjima, ali ne sme da se prelije.

Komponente kompleta

- Komponente se ne smeju koristiti nakon isteka roka trajanja odštampanog na etiketi.
- Ne kombinovati različite lotove reagenasa.
- Treba učiniti sve da se osigura da ne dođe do unakrsne kontaminacije između reagensa, uzoraka ili između bunara.
- Udubljenja ploče se ne mogu ponovo koristiti.

SAKUPLJANJE I ČUVANJE UZORAKA

Za proceduru je potrebno $<0,1$ mL krvi ili <50 mL seruma.

Sakupiti krv u obične epruvete za venepunkciju bez ikakvih aditiva i sprečiti hemolizu. Pripremiti serum prema uputstvima proizvođača. Odliti serum.

Uzorci seruma mogu se čuvati na 2-8 °C do osam nedelja, na 28 °C do jedne nedelje i na ≤ -20 °C do 16 nedelja. Zamrznute uzorke pre upotrebe treba odmrznuti i dobro izmešati blagim kružnim pokretima ili inverzijom.

Preporučujemo pripremu alikvota uzoraka seruma pre zamrzavanja kako bi se izbegli ponovljeni ciklusi zamrzavanja/odmrzavanja.

PROCEDURA TESTIRANJA

Postoje dve opcije:

- (1) Detekcija mix-izotipova (IgG i IgM): dodati mix obeležen enzimom u koraku 7
- (2) Detekcija IgG ili IgM izotipova: dodati ili IgG obeležen enzimom ili IgM obeležen enzimom u koraku 7

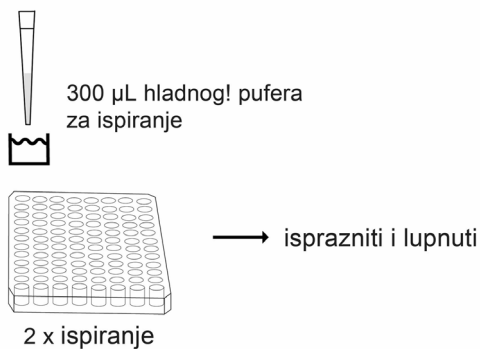
Napomena: Omogućiti da rastvor TMB supstrata dostigne sobnu temperaturu (18-28 °C).

1. Razblažiti uzorke 1:50 puferom za inkubaciju. Koristiti npr. 20 μ L seruma + 980 μ L hladnog! (2-8 °C) pufera za inkubaciju. Dobro izmešati vorteksiranjem i ostaviti razblažene uzorke, kao i rekonstituisane kalibratore i kontrole na 2-8 °C 30 minuta pre pipetiranja (pogledati korake 4a i b).
2. Pripremiti okvir ploče sa dovoljno stripova za testiranje potrebnog broja kalibratora, kontrola i uzoraka. Ukloniti višak stripova iz okvira i ponovo ga zatvoriti u foliju zajedno sa desikantom bez odlaganja. Čuvati u frižideru.

Napomena: u koracima 3 do 9 koristiti ihladne reagense.

3. Isprati udubljenja dva puta sa najmanje 300 μ L hladnog! (2-8 °C) pufera za ispiranje po udubljenju. Isprazniti udubljenja i snažno lupnuti ploču o ubrus da bi se

zaostala tečnost uklonila u potpunosti.



Napomena: odmah preći na sledeći korak.

4a. Pipetirati 100 µL kalibratora u udubljenje A1 (pogledati sliku 1A za opciju 1 ili sliku 1B za opciju 2).

4b. Pipetirati 100 µL srednje kontrole u udubljenje B1, niske kontrole u udubljenje A2 i negativne kontrole u udubljenje B2 (pogledati sliku 1A ili 1B).

Napomena za opciju 1: Ako se u seriji koristi više od tri stripa, kalibrator i kontrole se mogu testirati u duplikatu (pogledati sliku 1A).

Napomene za opciju 2: Kalibrator i kontrole treba testirati odvojeno za IgG i IgM izotipove (pogledati sliku 1B).

4c. Pipetirati 100 µL razblaženog uzorka 1 u udubljenja C1-H1 (pogledati sliku 1A ili 1B).

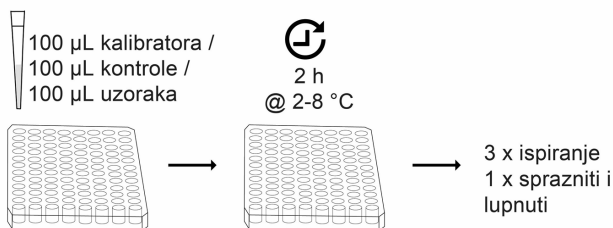
4d. Pipetirati 100 µL razblaženog uzorka 2 u udubljenja C2-H2 (pogledati sliku 1A ili 1B).

4e. Pipetirati 100 µL razblaženih uzoraka 3-24 (za opciju 1) ili 3-12 (za opciju 2) u naredna udubljenja (pogledati sliku 1A ili 1B).

Napomena za opciju 2: ponoviti pipetiranje uzoraka 1-12 istim redosledom u preostala udubljenja za testiranje sa drugim izotipom.

5. Pokriti ploču folijom i inkubirati 2 sata (± 5 min) na 2-8 °C (ne mućkati sadržaj u ploči).

6. Skinuti foliju. Isprazniti udubljenja i isprati tri puta sa najmanje 300 µL hladnog (2-8 °C) pufera za ispiranje po udubljenju. Isprazniti udubljenja i snažno lupnuti ploču o ubrus da bi se zaostala tečnost uklonila u potpunosti.



Za opciju 1: Detekcija mix-izotipa

7. Dodati 100 µL mixa u udubljenja.

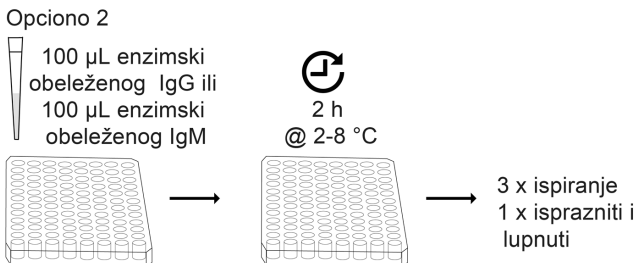
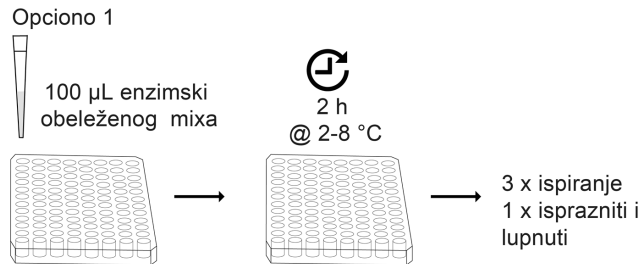
Za opciju 2: Detekcija IgG ili IgM izotipova

7'. Dodati 100 µL IgG obeleženog enzimom ili IgM u odgovarajuća udubljenja (pogledati sliku 1B).

8. Pokriti ploču folijom i inkubirati 2 sata (± 5 min) na 2-8 °C (ne mućkati sadržaj u ploči).

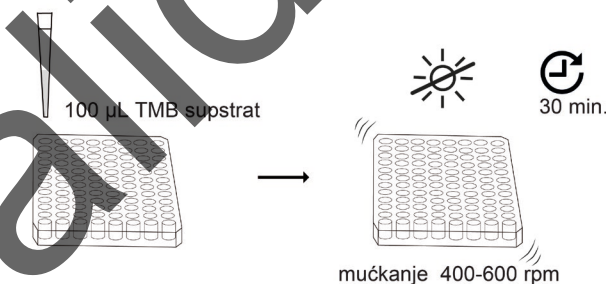
9. Skinuti foliju. Isprazniti udubljenja i isprati tri puta sa najmanje 300 µL hladnog (2-8 °C) pufera za ispiranje po udubljenju. Isprazniti udubljenja i snažno lupnuti ploču o

ubrus da bi se zaostala tečnost uklonila u potpunosti.



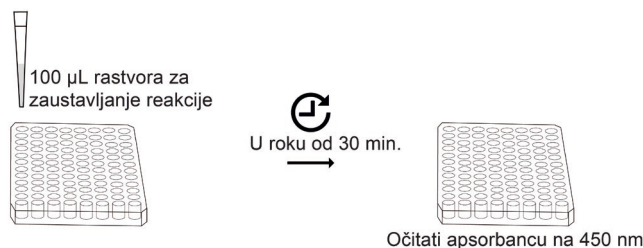
10. Dodati 100 µL rastvora TMB supstrata (koji je dostigao sobnu temperaturu) u svako udubljenje.

11. Pokriti ploču folijom, zaštititi od svetla i inkubirati na šejkeru za ploče koji je podešen na 400-600 rpm, na 18-28 °C 30 \pm 2 minuta.



12. Dodati 100 µL rastvora za zaustavljanje reakcije u svako udubljenje. Pomoću nastavka za pipete ukloniti sve mehuriće vazduha. Preći na korak 13 unutar 30 minuta.

13. Očitati apsorbancu na 450 nm na čitaču za mikrotitar ploče.



KONTROLA KVALITETA

Za uspešnu upotrebu proizvoda neophodno je detaljno razumevanje ovog uputstva za upotrebu. Pouzdani rezultati će se dobiti samo korišćenjem preciznih laboratorijskih tehnika i tačnim poštovanjem ovog uputstva za upotrebu.

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA kit dolazi sa tri kontrole: negativna, niska i srednja kontrola. Kontrolama su dodeljeni rasponi vrednosti (% Ratio) naznačeni na QC podacima koji se isporučuju sa svakim kompletom. Rezultati merenja kontrola moraju biti unutar naznačenih opsega vrednosti da bi rezultati bili validni.

Pored kontrola kompleta, preporučujemo upotrebu pula seruma za internu kontrolu kvaliteta.

Minimalna OD_{450nm} vrednost od 1.2 se preporučuje za kalibrator.

Karakteristike performansi treba da budu unutar ustanovljenih limita. Ako performanse testa ne zadovoljavaju utvrđene granice i ponavljanje je isključilo greške u tehnici, proveriti sledeća pitanja: i) kontrolu temperature (reagensi koji se koriste u koraku 3-9 čuvaju se na 2-8 °C) ii) tačnost termometara, uređaja za pipetiranje i merenje vremena; iii) podešavanja ELISA čitača; iv) rok upotrebe reagensa; v) uslove skladištenja i inkubacije; vi) boju rastvora TMB supstrata (treba da bude bezbojan); vii) čistoću vode; viii) metode aspiracije i ispiranja.

STANDARDIZACIJA I METROLOŠKA SLEDLJIVOST

Ne postoje međunarodno ili nacionalno priznati referentni materijali ili referentni postupci merenja za anti-gangliozidna ili anti-MAG antitela u uzorcima seruma. BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA je standardizovan u odnosu na interno ustanovljen referentni materijal. Vrednosti kalibratora se dodeljuju u skladu sa protokolom prenosa vrednosti (ref. 2), kako bi se garantovala metrološka sledljivost, i naznačene su u proizvoljnim jedinicama % „odnosa“. Utvrđeno je da je interval poverenja od 95% kombinovane nesigurnosti kalibratora proizvođača 29,3% za IgG antitela i 37,6% za IgM antitela.

IZRAČUNAVANJE REZULTATA TESTA

1. Zabeležiti apsorbancu (OD) na 450 nm za svako udubljenje (kalibrator, kontrole i uzorci).
2. Ako su kalibrator i kontrole više puta testirani, izračunati prosečnu vrednost.

Rezultati se izražavaju kao Odnos apsorbance uzoraka i (srednja) vrednost kalibratora.

Mix izotipovi

$$\% \text{ Odnosa: } \frac{\text{apsorbanca uzoraka ili kontrola}}{\text{apsorbanca kalibratora}} \times 200$$

IgG i IgM izotipovi

$$\% \text{ Odnosa: } \frac{\text{apsorbanca uzoraka ili kontrola}}{\text{apsorbanca kalibratora}} \times 100$$

Programi za izračunavanje rezultata kao % Odnosa su dostupni na većini čitača za mikrotitar ploče.

Napomena: Rezultati predstavljeni u tabelama 7 i 8 su primeri obezbeđeni isključivo u svrhu demonstracije.

OGRANIČENJA

- Visok % Odnosa rezultata (>100%) za pojedinačne gangliozide može biti rezultat ukrštene reaktivnosti sa drugim gangliozidima za isti uzorak. Ukrštena reaktivnost će se tipično javiti kao visoka varijacija između testova. Interpretaciju rezultatu stoga treba vršiti isključivo u saradnji sa stručnjakom/specijalistom.
- Zbog polireaktivnosti autoimunih antitela i razlike u geografskoj prevalenciji, rezultate testa treba koristiti samo kao podršku kliničkoj interpretaciji neuropatije od strane stručnjaka/specijaliste, u kombinaciji sa kliničkom slikom pacijenta (ref.3).

- Ovaj test nije validiran za pacijente nakon plazmafereze.
- Intravenski imunoglobulini (IVIg) mogu uticati na rezultate testa.

REFERENTNI INTERVALI I CUT-OFF

Referentni intervali BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA su ustanovljeni u skladu sa CLSI C28-A3 testiranjem 120 uzoraka seruma osoba koje su se izjasnile kao zdrave. Učestalost distribucije anti-gangliozidnih i anti-MAG antitela kod zdravih davalaca krvi je klasifikovana u kategorije titra: negativni (<30% Odnosa), siva zona (30-50% Odnosa) i pozitivni (>50% Odnosa). Rezultati su sumirani u tabeli 9. Granična vrednost za pozitivnost je Odnos 50%.

INTERPRETACIJA REZULTATA

Antigen	IgG/IgM Mix		
	Vrednosti (% Odnos)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Negativni	Pogledati napomenu*/**	Pogledati napomenu*/**
GM1		Ponoviti testiranje kasnije	Pozitivni
GT1a			
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

Tabela 3

Antigen	IgG		
	Vrednosti (% Odnos)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Negativni	Pogledati napomenu*	Pogledati napomenu*
GM1		Ponoviti testiranje kasnije	Pozitivni
GT1a			
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

Tabela 4

Antigen	IgM		
	Vrednosti (% Odnos)		
	<30	30-50	>50
HNK-1	Negativni	Pogledati napomenu**	Pozitivni (Pogledati napomenu**)
GM1		Ponoviti testiranje kasnije	Pozitivni
GT1a			
GD1a			
GD1b			
GQ1b			

Tabela 5

Rezultate testa treba tumačiti zajedno sa dostupnim informacijama dobijenih kliničkom procenom pacijenta i drugim dijagnostičkim procedurama.

* MAG neuropatije su obično udružene sa prisustvom anti-MAG antitela IgM izotipa (ref. 4).

** Rezultati između 30 i 50% (siva zona) ili > 50% (pozitivni) za HNK-1 dobijeni sa mixom ili enzimski obeleženim IgM mogu se testirati ponovo sa anti-MAG Antibodies ELISA (EK-MAG).

KARAKTERISTIKE PERFORMANSI

Metod poređenja

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA vs anti-MAG Antibodies ELISA

Studija poređenja metoda je sprovedena prema CLSI smernicama EP09-A3 i EP12-A2. Sto dvadeset i dva (122) uzorka su izmerena korišćenjem 2 lota BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA i 2 lota anti-MAG antitela ELISA. Utvrđena su dijagnostička (kapa) slaganja, negativan procenat saglasnosti i pozitivan procenat saglasnosti. Slaganja su predstavljena u tabeli 10.

Preciznost unutar laboratorije

Za anti-gangliozidna antitela: 5,7 – 13,2% CV

Za anti-MAG antitela: 14,4 – 36,5% CV

Preciznost unutar laboratorije je utvrđena u skladu sa CLSI smernicom EP05-A3 korišćenjem standardizovanog dizajna studije 20 dana x 2 serije x 2 ponavljanja. Testirana su tri (3) pulirana uzorka seruma pacijenata. Rezultati su sumirani u tabeli 11.

Reproducibilnost

Za anti-gangliozidna antitela: 7,7 – 19,1% CV

Za anti-MAG antitela: 23,5 – 33,2% CV

Reproducibilnost je utvrđena u skladu sa CLSI smernicom EP05-A3 korišćenjem dizajna studije sa 3 instrumenta/lot/operatera x 5 dana x 5 ponavljanja. Testirana su tri (3) pulirana uzorka seruma pacijenata. Rezultati su sumirani u tabeli 12.

Limit slepe probe (LoB) ≤ Limit detekcije (LoD): ≤30% Odnos

LoB i LoD su utvrđeni u skladu sa CLSI smernicom EP17-A2 korišćenjem neparametarske analize. Rezultati su sažeti u tabeli 13.

Visokodozni hook efekat

Na opseg merenja nije uočeno ograničenje zbog visokodoznog hook efekta.

Ukrštena reaktivnost

Nije primećena sistematska unakrsna reaktivnost za uzorke pacijenata sa različitim autoimunim bolestima (tabela 14) i pacijenata sa drugim neurološkim poremećajima (tabela 15).

KLINIČKE PERFORMANSE

Kliničke performanse su procenjene sumirajućim analizama recenzirane naučne literature. Šest (6) studija bavilo se kliničkim performansama BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA u dijagnozi autoimunih perifernih neuropatija (ref. 5-10). Rezultati analize i detalji studije dati su u tabeli 6 i tabeli 16, tim redosledom.

N periferne neuropatije	201 (102 pedijatrijski GBS, 14 CIDP, 44 GBS, 41 neuropatija sa anti-MAG antitelima)
N kontrole	493 (104 DC, 254 NC, 135 HC)
Senzitivnost (95% CI)	68,1% (39,6 – 87,5%)
Specifičnost (95% CI)	88,0% (72,3 – 95,3%)
ROC AUC	0,85

Tabela 6

GBS, Guillain-Barré-Syndrome; DC, Non-Neurological Disease Control; NC, Neurological Control; HC, Healthy Control; CIDP, Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy; CI, confidence interval; ROC AUC, area under receiver operating characteristic curve

INTERFERIRAJUĆE SUPSTANCE

Osetljivost testa na oralne i injekcione lekove, kao i na endogene supstance je procenjena prema CLSI smernici EP07-A3. Bias u rezultatima $\geq \pm 20\%$ Odnosa se smatra interferencijom.

Nije detektovana interferencija sa sledećim supstancama do navedenih koncentracija: intravenski imunoglobulin (20 mg/mL), rituksimab (3 mg/mL), kladribin (273 ng/mL), interferon alfa-2a (49,5 ng/mL), gabapentin (26,7 µg/mL), ibuprofen (0,22 mg/mL), hlorambucil (1,96 µg/mL), prednizon (99 ng/mL), prednizolon (1,2 µg/mL), reumatoidni faktor (2340 IU/mL), hemoglobin (10 mg/mL), hemolizat (10 mg/mL), trigliceridi (15 mg/mL), konjugovani bilirubin (20 µg/mL), nekonjugovani bilirubin (150 µg/mL).

TABELE I SLIKE

Raspored na mikrotitar ploči: IgG/IgM-Mix obeleživač

		IgG/IgM Mix													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Calibrator & Controls	CAL	CTRL	CAL	CTRL	CAL	CTRL	CAL	CTRL	CAL	CTRL	CAL	CTRL	CAL	CTRL	A
	Med	Neg	Med	Neg	Med	Neg	Med	Neg	Med	Neg	Med	Neg	Med	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

Slika 1A: ≤ 24 seruma / kitu (2 MP / kitu)

Raspored na mikrotitar ploči: IgG & IgM obeleživač

		IgG						IgM							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Calibrator & Controls	CAL	CTRL	CAL	CTRL	CAL	CTRL	CAL	CTRL	CAL	CTRL	CAL	CTRL	CAL	CTRL	A
	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low	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

Slika 1B : 2 profila / serum, ≤ 12 seruma / kitu (2 MP / kitu)

**Primer rezultata
A IgG/IgM-Mix obeleživač**

B-GCO-ELGM	Apsorbanca (OD450)	Odnos [%]
Kalibrator	2,179 2,477 2,328	100
Kalibrator Avg.		
Srednja kontrola	1,737 1,891 1,814	78
Srednja kontrola Avg.		
Niska kontrola	0,662 0,460 0,561	24
Niska kontrola Avg.		
Negativna kontrola	0,044 0,046 0,045	2
Negativna kontrola Avg.		
Uzorak 1 HNK-1	0,234	10
Uzorak 1 GM1	0,543	23
Uzorak 1 GT1a	1,976	85
Uzorak 1 GD1a	0,621	27
Uzorak 1 GD1b	0,734	32
Uzorak 1 GQ1b	2,573	111

Tabela 7

B IgG & IgM obeleživač

Enzimski obeleživač	Apsorbanca (OD450)		Odnos [%]	
	IgG	IgM	IgG	IgM
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM				
Kalibrator	2,488 2,446 2,467	2,411 2,201 2,306	100	100
Kalibrator Avg.				
Srednja kontrola	1,879 1,987 1,933	1,734 1,818 1,776	78	77
Srednja kontrola Avg.				
Niska kontrola	0,452 0,716 0,584	0,501 0,609 0,555	24	24
Niska kontrola Avg.				
Negativna kontrola	0,045 0,037 0,041	0,048 0,042 0,045	2	2
Negativna kontrola Avg.				
Uzorak 1 HNK-1	0,423	0,621	17	27
Uzorak1 GM1	2,001	2,102	81	91
Uzorak1 GT1a	0,521	0,237	21	10
Uzorak1 GD1a	1,984	0,821	80	36
Uzorak 1 GD1b	0,473	1,923	19	83
Uzorak 1 GQ1b	0,094	0,911	4	40

Tabela 8

TABELE I SLIKE

Reference interval

Analit	% zdravih davalaca krvi u kategorijama			Referentni limit <30 % odnosa
	<30 % odnosa	30 - 50 % odnosa	>50 %Ratio	
anti-MAG IgG	96,7	2,5	0,8	25 (15,7 – 39,5)
anti-MAG IgM	99,2	0,8	0,0	20 (18,6 – 28,4)
anti-MAG IgGM	86,7	10,0	3,3	44 (34,8 – 52,9)
anti-GM1 IgG	99,2	0,8	0,0	16 (13,0 – 29,8)
anti-GM1 IgM	95,8	3,3	0,8	24 (14,3 – 40,3)
anti-GM1 IgGM	95,0	4,2	0,8	34 (23,3 – 49,5)
anti-GT1a IgG	90,0	6,7	3,3	44 (35,9 – 113,1)
anti-GT1a IgM	97,5	2,5	0,0	16 (10,3 – 31,8)
anti-GT1a IgGM	85,0	10,0	5,0	50 (42,4 – 140,3)
anti-GD1a IgG	91,7	5,0	3,3	42 (26,2 – 108,2)
anti-GD1a IgM	100,0	0,0	0,0	8 (6,6 – 12,4) ^F 18 (6,6 – 24,3) ^M
anti-GD1a IgGM	88,3	5,8	5,8	53 (35,0 – 118,7)
anti-GD1b IgG	97,5	1,7	0,8	21 (14,5 – 33,0)
anti-GD1b IgM	99,2	0,0	0,8	15 (6,3 – 15,5) ^F 9 (6,4 – 54,7) ^M
anti-GD1b IgGM	95,0	3,3	1,7	30 (22,3 – 71,6)
anti-GQ1b IgG	97,5	2,5	0,0	24 (14,6 – 33,4)
anti-GQ1b IgM	99,2	0,8	0,0	8 (6,2 – 17,8)
anti-GQ1b IgGM	95,0	4,2	0,8	31 (23,1 – 46,7)

F podgrupa Žena. M podgrupa muškaraca

Tabela 9

Metod poređenja anti-MAG antitela

Opis	N	Kapa slaganje		NPA		PPA	
		Vrednost	95% CI	Vrednost	95% CI	Vrednost	Vrednost
EK-GCM IgM vs. EK-MAG	12 2	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	12 2	0,87	0,78 - 0,96	97,0%	89,5% - 99,6%	89,3%	78,1% - 96,0%

Tabela 10

NPA: Procenat negativnog slaganja

PPA: Procenat pozitivnog slaganja

CI: Interval pouzdanosti

Preciznost unutar laboratorije

Opis uzorka			Preciznost unutar laboratorije			
Analit	Enzimski obeleživač (izotip)	Očekivana kategorija [% Odnosa]	N	Sred.vred. [%Odnos]	SD [%Odnos]	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-MAGAb	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

Tabela 11

Reproducibilnost

Opis uzorka			Reproducibilnost			
Analit	Enzimski (izotip)	Očekivana kategorija [% Odnosa]	N	Sred.vred. [% Odnosa]	SD [% Odnosa]	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-MAGAb	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

Tabela 12

LoD i LoB

Analit	LoB [% Odnosa]	LoD [% Odnosa]
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

Tabela 13

Ukrštena reaktivnost

Označeno antitelo	Dijagnoza	#
Antitela na citoplazmu neutrofila (ANCA)	Vaskulitis	3
	Drugo (ANCA pozitivno označeni uzorci)	10
Anti-nukleusna antitela (ANA)	Sistemska eritemski lupus	5
	Reumatoidni artritis	9
	Sjogren sindrom	6
	Drugo (ANA pozitivno označeni uzorci)	3
Anti-tireoglobulinska antitela (anti-Tg)	Autoimuni tiroitidis	5
Anti-ribonukleoproteinska antitela	Mešovite bolesti vezivnog tkiva	1
Antitela na GQ1b, anti-GM1, anti-GD1b	Autoimune periferne neuropatije	1
Antitela na acetilholin receptor i tirozin kinazu specifična za mišiće	Myasthenia gravis	7

Tabela 14

Periferna neuropatija	#
Alkohol	1
Dijabetes	5
Periferna neuropatija koja oponaša poremećaje	#
Amiotrofična lateralna skleroza (ALS)	15
Sarkoidoza	4
Waldenstromova makroglobulinemija (WM)	4
Šagasova bolest	5

Tabela 15

TABELE I SLIKE

Kliničke performance

Studija	Pozitivne kontrole (slučajevi)	Negativne kontrole	Epitopi	Senzi-tivnost	Speci-fičnost
Hashemilar et al., 2014	Pedijatrijski GBS (n = 45)	DC (n = 35)	GM1	0,51	0,89
			GQ1b	0,56	0,74
Sharma et al., 2011	Pedijatrijski 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-neuropatija (n = 41)	NC (n = 112) HC (n = 6)	HNK-1 (MAG)	0,98	0,99

Tabela16

GBS, Guillain-Barré-Syndrome; DC, Non-Neurological Disease Control; NC, Neurological Control; HC, Healthy Control; MFS, Miller Fisher Syndrome; CIDP, Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy

BÜHLMANN GanglioCombi® MAG ELISA

Obložena mikrotitar ploča



isprati 2 x sa $\geq 300 \mu\text{L}$ (hladnog)! pufera za ispiranje

100 μL kalibratora, kontrola ili uzoraka seruma (1:50)



inkubirati 2 sata (± 5 min) na 2-8 °C

isprati 3 x sa $\geq 300 \mu\text{L}$ (hladnog)! pufera za ispiranje

dodati 100 μL enzimskog(ih) obeleživača



inkubirati 2 sata (± 5 min) na 2-8 °C

isprati 3 x sa $\geq 300 \mu\text{L}$ (hladnog)! pufera za ispiranje

dodati 100 μL TMB supstrata (ambijentalna temperatura)!



*inkubirati 30 min (± 2 min) na 18-28 °C
na šejkeru za ploče ~400-600 rpm*

dodati 100 μL rastvora za zaustavljanje reakcije (ambijentalna temperatura)!

→ Očitati apsorbancu na 450 nm (unutar 30 minuta)

VREME ZA REZULTATE: 4,5 SATA

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., Schluep, 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).

LOG IZMENA

Datum	Verzija	Izmena
2023-08-17	A1	Izmena <i>Namenjena upotreba</i> i naziv proizvoda Uklanjanje GM2 gangliozida i uvođenje GT1a gangliozida Preformulisanje <i>Principa testa</i> sa kategorijama titra negativan, siva zona, pozitivan Novine u stabilnosti reagenasa prilikom upotrebe Ažuriranje poglavlja <i>Upozorenja i mere opreza</i> Revizija poglavlja <i>Sakupljanje i čuvanje uzoraka, Procedura testiranja, i Standardizacija i metrološka sledljivost</i> Preformulisanje poglavlja <i>Kontrola kvaliteta</i> Ažuriranje poglavlja <i>Ograničenja</i> Revizija poglavlja <i>Referentni intervali i cut-off, Karakteristike performansi, i Interferirajuće supstance</i> Uvođenje poglavlja <i>Kliničke performanse</i> Revizija poglavlja <i>Reference i Simboli</i> Uključivanje broja notifikovanog tela u CE oznaku – postupak ocenjivanja usaglašenosti prema IVDR 2017/746

ZVEŠTAVANJE O INCIDENTIMA U ZEMLJAMA EU

Ako se desio bilo kakav ozbiljan incident u vezi sa ovim medicinskim sredstvom, molimo da ga bez odlaganja prijavite proizvođaču i nadležnom organu svoje države članice EU.

OŠTEĆENJE PRILIKOM TRANSPORTA

Ukoliko ste proizvod primili u oštećenom stanju, molimo da kontaktirate svog distributera.

SIMBOLI

BÜHLMANN koristi simbole i oznake navedene u ISO 15223-1 standardu. Dodatno se koriste sledeći simboli i oznake:

Simbol	Objašnjenje
MP	Mikrotitar ploča
BUF WASH 10X	Pufer za ispiranje, koncentrat (10x)
BUF INC	Pufer za inkubaciju
CAL	Kalibrator
CONTROL -	Negativna kontrola
CONTROL L	Niska kontrola
CONTROL M	Srednja kontrola
EL IgG	Enzimski obeležen IgG
EL IgM	Enzimski obeležen IgM
EL MIX	IgG/IgM Mix obeležen enzimom
SUBS TMB	TMB Supstrat
SOLN STOP	Rastvor za zaustavljanje reakcije

invalid

CE 0123