BÜHLMANN

GanglioCombi™ MAG ELISA

s enzymovými značkami IgG/IgM Mix, IgG a IgM

Detekce autoprotilátek proti gangliosidu a -MAG metodou ELISA

("MAG", GM1, GM2, GD1a, GD1b, a GQ1b)

BÜHLMANN LABORATORIES AG
Baselstrasse 55
CH - 4124 Schönenbuch
Switzerland Tel.: +41 61 487 1212
CH - 4124 Schönenbuch
Fax: +41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch

Zplnomocněný zástupce výrobce v ČR
BioVendor – Laboratorní medicína a.s.
IČ: 63471507
Karásek 1767/1, 621 00 Brno
tel: +420 549 124 111
Mail: info@biovendor.cz www.biovendor.cz

ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

BÜHLMANN GanglioCombiTM MAG ELISA je in vitro diagnostický test určený k detekci autoprotilátek proti definovaným relevantním nervovým antigenům/epitopům ve vzorcích séra pacientů s podezřením na periferní neuropatie s neznámou etiologií. Umožňuje kvantitativní klasifikaci výsledků do titračních kategorií a slouží jako pomůcka při diagnostice neuropatií (viz 1-7).

ZAMÝŠLENÁ APLIKACE

Pokud jde o 3 různé enzymové štítky, komponenty zařízení umožňují tři možnosti použití:

1. Testování pomocí konjugátu směsi IgG/IgM umožňuje vyšetřit přítomnost autoprotilátek a indikovat možnou autoimunitní neuropatii.
2. Testování s jednotlivými konjugáty IgG a/nebo IgM umožňuje stanovit izotyp autoprotilátek.
3. Při laboratorním vyšetření může po počátečním screeningu vzorků pomocí směsi enzymových značek IgG/IgM (možnost 1) následovat diferenciace vzorků pozitivních na směs pomocí jednotlivých konjugátů IgG a IgM (možnost 2) po předchozí konzultaci s klinickým lékařem/referujícím neurologem.

PRINCIP TESTU

BÜHLMANN GanglioCombiTM MAG ELISA je založen na enzymově-imunometrické technice. Jamky dodané mikrotitrační destičky jsou potaženy gangliosidy: GM1, GM2, GD1a, GD1b a GQ1b a syntetickým "mimotopem" MAG (myelin asociovaný glykoprotein). MAG "mimotop" je syntetický sulfatovaný disacharid. Napodobuje sacharidový epitop MAG, HNK-1, rozpoznávaný autoprotilátkami proti MAG.
Kalibrátor, kontroly a séra pacientů se inkubují v mikrotitračních jamkách a protilátky proti gangliosidům a/nebo autoprotilátky proti MAG přítomné ve vzorcích se vážou na imobilizované gangliosidy nebo analogy MAG. Po promytí nenavázaných látek se protilátky detekují pomocí protilátek proti lidskému IgG a/nebo IgM značených křenovou peroxidázou (HRP). Po druhém promytí, při kterém se odstraní nenavázané enzymové značení, se přidá substrátový roztok obsahující tetrametylbenzidin (TMB). Modré zbarvení vzniká úměrně množství protilátek navázaných na imobilizované gangliosidy nebo MAG-analog. Vývoj barvy se zastaví přidáním kyselého zastavovacího roztoku (zředěná kyselina sírová), který změní modrý roztok na žlutý. Intenzita barvy se měří při vlnové délce 450 nm.
Naměřená absorbance je úměrná titru autoprotilátek přítomných v daném vzorku. Titry autoprotilátek se vyjadřují v % poměru ke kalibrátoru a lze je přiřadit ke kategoriím titru (negativní, šedá zóna, pozitivní, silně pozitivní).

REAGENCIE DODÁVANÉ A JEJICH STAV

Reagencie	Množství	Kat.č.	Stav
Mikrotitrační destička Předem potažená gangliosidy a analogem MAG	2 x 12 x 8 jamek	B-GCM-MP	Připraveno k použití
Těsnění destičky	6 ks		
Promývací pufr koncentrát (10x) s konzervanty	2 lahve 100 ml	B-GCO-WB	Naředěno s 900 ml deionizované vody
Inkubační pufr s konzervanty	1 lahev 100 ml	B-GCO-IB	Připraveno k použití
Kalibrátor Lyofilizovaný s konzervanty	1 lahvička	B-GCO-CA	Přidat 1.5 ml inkubačního pufru
Negativní, Low a Medium kontrola Lyofilizovaná s konzervanty	3 lahvičky	B-GCO-CONSET	Přidat 1.5 ml inkubačního pufru
Enzymový štítek IgG/IgM Mix Anti-human IgG a IgM Ab konjugované s HRP v proteinovém pufru s konzervačními látkami	2 lahvičky 11 ml každá	B-GCO-ELGM	Připraveno k použití
Enzymový štítek IgG Anti-human IgG Ab konjugované s HRP v proteinovém pufru s konzervačními látkami	1 lahvička 11 ml	B-GCO-ELG	Připraveno k použití

Enzymový štítek IgM Anti-human IgM Ab konjugované s HRP v proteinovém pufru s konzervačními látkami	1 lahvička 11 ml	B-GCO-ELM	Připraveno k použití
TMB substrát TMB v citrátovém pufru	2 lahvičky 11 ml	B-TMB	Připraveno k použití
Zastavovací roztok 0.25 M kyselina sírová	2 lahvičky 11 ml	B-STS	Připraveno k použití **Žíravina**

SKLADOVÁNÍ A STABILITA PO OTEVŘENÍ

Zapečetěné/ neotevřené reagencie	
Všechny uzavřené/neotevřené součásti soupravy jsou stabilní při teplotě 2-8 °C až do data expirace uvedeného na štítcích.	
Otevřené/ rekonstituované reagencie	
Mikrotitrační destička	Nepoužité proužky ihned vraťte do hliníkového sáčku obsahujícího vysoušecí obaly a znovu je uzavřete podél celého okraje zipu. Uchovávejte až 4 měsíce při teplotě 2-8 °C.
Naředěný mycí pufr	Skladujte až 4 měsíce při 2-8 °C.
Kalibrátor	Skladujte až 4 měsíce při 2-8 °C. **Nezmrazovat!**
Kontroly	
Inkubační pufr	Skladujte při 2-8 °C do data expirace.
Enzymový štítek	
TMB substrát	
Zastavovací roztok	Skladujte při 18-28 °C do data expirace.

MATERIÁLY POŽADOVANÉ, ALE NEDODÁVANÉ

- Přesné pipety s jednorázovými špičkami: 20 µl, 100 µl a 1000 µl pipety
- Jednorázové polystyrenové nebo polypropylenové zkumavky pro přípravu ředění vzorků
- 1000 ml válec pro rekonstituci promývacího pufru
- Stlačovací láhev na promývací pufr nebo automatická myčka mikrotitračních destiček
- Blotovací papír
- Orbitální třepačka pro mikrotitrační destičky
- Čtečka mikrotitračních destiček pro měření absorbance při 450 nm

OPATŘENÍ

Bezpečnostní opatření

- Kalibrátor (B-GCO-CA) i kontroly (B-GCO-CONSET) této soupravy obsahují složky lidského původu. Přestože byly testovány a shledány negativními na povrchový antigen HBV, HCV a protilátky HIV1/2, mělo by se s těmito reagenciemi zacházet, jako by mohly přenášet infekce, a mělo by se s nimi zacházet v souladu se správnou laboratorní praxí za použití vhodných bezpečnostních opatření.
- Zastavovací roztok: Stop roztok (B-STS) obsahuje kyselinu sírovou (0,25 M). Tato reagencie dráždí oči, kůži a sliznice. Zabraňte kontaktu s očima, kůží a oděvem. Po kontaktu s očima nebo kůží je okamžitě omyjte velkým množstvím vody.
- Reagencie: Vyvarujte se kontaktu reagencií s kůží, očima nebo sliznicemi. Dojde-li ke kontaktu, okamžitě je omyjte velkým množstvím vody, jinak může dojít k podráždění / popálení.
- Nepoužitý roztok zlikvidujte v souladu s místními předpisy**.**

Technická opatření

- Před provedením testu si pečlivě přečtěte pokyny. Pokud jsou reagencie nesprávně naředěny, upraveny nebo skladovány za jiných podmínek, než jsou uvedeny v tomto návodu k použití, bude to mít nepříznivý vliv na výsledky testu.
- Zbytky v jamkách mikrotitrační destičky jsou výsledkem výrobního procesu. Odstraňují se při promytí (krok 3 postupu stanovení) a nemají vliv na výsledky.
- Před zahájením postupu stanovení si připravte reagencie. Reagencie použité v krocích 3-9 musí být studené (2-8 ˚C) a během pipetování a promývání musí být udržovány v chladu. Substrát TMB uchovávejte při pokojové teplotě (18-28 ˚C).
- Kroky 3-9: Pro všechny tyto kroky použijte studené (2-8 °C) reagencie a udržujte je při pipetování v chladu. Doporučení: Večer před provedením testu připravte promývací pufr a dejte jej přes noc do chladničky.
- Promývací kroky 3, 6 a 9: Promývací kroky jsou rozhodující pro odstranění zbytků v jamkách mikrotitrační destičky, které vznikly při výrobním procesu (krok 3), a také pro odstranění všech nenavázaných protilátek (kroky 6 a 9).

- → Promývací kroky provádějte vždy se studeným (2-8 ˚C) promývacím pufrem.
- → Ujistěte se, že jsou všechny jamky po posledním promývacím cyklu zcela prázdné.
- Krok 9: Před použitím substrátu TMB jej nechejte vytemperovat na pokojovou teplotu (18-28 °C).
- Krok 11: Během inkubace se substrátem mikrotitrační destičky protřepejte. V závislosti na orbitální třepačce destiček doporučujeme 400-600 otáček za minutu. Roztok by se měl v jamkách pohybovat, ale nesmí se přelévat.
- Pokud se používá automatická myčka, měl by být zvolen "plate mode", aby se dávkování provádělo postupně na všechny proužky před odsáváním.
- Komponenty se nesmí používat po uplynutí doby použitelnosti vytištěné na štítcích.
- Nemíchejte různé šarže reagencií.
- Je třeba vynaložit veškeré úsilí, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi reagenciemi, vzorky nebo jamkami.
- Mikrodestičky nelze použít opakovaně.

ODBĚR VZORKU A SKLADOVÁNÍ

K provedení testu je zapotřebí <0,1 ml krve, resp. <50 µl séra.

- Informace o interferenci hemolyzovaných, lipemických nebo iktерických vzorků naleznete na straně 7.
- Odeberte krev do obyčejných zkumavek (bez protisrážlivých látek), zabraňte hemolýze, nechte ji hodinu srážet, odstřeďte po dobu 10 minut při přibližně 1500 x g při pokojové teplotě (18-28 °C), odeberte sérum.
- Pokud potřebujete vzorky pacientů skladovat, doporučujeme alikvoty vzorků zmrazit, abyste se vyhnuli opakovanému zmrazování/rozmrazování.
- Vzorky séra skladujte při -20 °C až 4 měsíce. Pro dlouhodobé skladování doporučujeme -70 °C (vzorky jsou stabilní po dobu > 1 roku). Zmrazené vzorky je třeba před použitím rozmrazit a důkladně promíchat.

POSTUP TESTU

Můžete si vybrat ze tří základních možností:

(1) Detekce směsi izotypů IgG/IgM: krok 4a-4e a 7.
(2) Detekce izotypů IgG a IgM: krok 4a'-4f'a 7'.
(3) Dvoukrokový přístup: Varianta 1 → vzorky pozitivní na autoimunitní protilátky → varianta 2.

Poznámka: Vytemperujte substrát TMB na pokojovou teplotu (18-28 ˚C).

1. Všechny vyšetřované vzorky pacientů nařeďte 1:50 inkubačním pufrem. Použijte 30 µl séra + 1470 µl (studeného: 2- 8 °C!) inkubačního pufru. Promíchejte vířením a před pipetováním nechte naředěné vzorky i rekonstituovaný kalibrátor a kontroly 30 minut při 2-8 °C (viz krok 4a a b).
2. Připravte si rámeček na destičky s potřebným počtem proužků pro testování vzorků pacientů. Zbývající proužky ihned znovu uzavřete do fóliového sáčku spolu s vysoušecími obaly. Uchovávejte v chladu.
Poznámka: V krocích 3 až 9 použijte chladné reagencie.
3. Potažené jamky dvakrát promyjte za použití nejméně 300 µl studeného! promývacího pufru na jamku. Vyprázdněte jamky a pevně poklepejte destičkou na blotovací papír, abyste zcela odstranili zbývající tekutinu.
Poznámka: Okamžitě přejděte k dalším krokům.

Možnost 1: Detekce směsných izotypů IgG/IgM
4a. Kalibrátor: Do jamky A1 (viz obrázek 1A) napipetujte 100 µl kalibrátoru.
4b. Kontroly: Do jamky B1 napipetujte 100 µl střední kontroly, do jamky A2 nízkou kontrolu a do jamky B2 negativní kontrolu (viz obrázek 1A).
Poznámka: Pokud se v jedné sérii používají více než tři proužky, lze kalibrátor a kontroly testovat duplicitně (viz obrázek 1A).
4c. Sérum pacienta: Pipetujte 100 µl naředěného pacientského séra 1 do jamek C1-H1 (viz obrázek 1A).
4d. Pacientské sérum: Pipetujte 100 µl naředěného pacientského séra 2 do jamek C2-H2 (viz obrázek 1A).
4e. Do dalších jamek napipetujte 100 µl naředěných pacientských sér 3-24 (viz obrázek 1A).

Možnost 2: Detekce izotypů IgG
4a'. Kalibrátor: Do jamky A1 napipetujte 100 µl kalibrátoru (viz obrázek 1B).
4b'. Kontroly: Do jamky B1 napipetujte 100 µl střední kontroly, do jamky A2 nízkou kontrolu a do jamky B2 negativní kontrolu (viz obrázek 1B).
Poznámka: Pokud se používají více než tři proužky pro každý izotyp, lze kalibrátor a kontroly testovat duplicitně (viz obrázek 1B).
4c'. Sérum pacienta: Do jamek C1-H1 napipetujte 100 µl naředěného pacientského séra 1 (viz obrázek 1B).
4d'. Pacientské sérum: Pipetujte 100 µl naředěného pacientského séra 2 do jamek C2-H2 (viz obrázek 1B).
4e'. Do dalších jamek napipetujte 100 µl naředěných pacientských sér 3-12.

Detekce izotypů IgM.
4f'. Opakujte kroky 4a'-4e' s použitím dalších jamek nebo v případě potřeby nové mikrotitrační destičky (viz obrázek 1B).

Pro možnosti 1 a 2: Inkubace a promývání vzorku
5. Přikryjte destičku těsnicí vrstvou a inkubujte 2 hodiny ±5 minut při teplotě 2-8 °C (destičkou netřepejte).
6. Odstraňte těsnění destiček. Vyprázdněte jamky a třikrát promývejte s použitím nejméně 300 µl studeného promývacího pufru (2-8 °C) na jamku. Vyprázdněte jamky a pevně udeřte destičkou do blotovacího papíru, aby se promývací pufr zcela odstranil.

Pro možnost 1: Detekce směsi IgG/IgM mix- izotyp
7.Do jamek přidejte 100 µl směsi IgG/IgM značené enzymem.

Pro možnost 2: Detekce izotypů IgG a IgM
7‘. Do příslušných jamek přidejte 100 µl směsi IgG nebo IgM značené enzymem (viz obrázek 1B).

Pro možnost 1 a 2: Inkubace s enzymovými značkami, promývání a detekce
8. Přikryjte destičku těsnicí vrstvou a inkubujte 2 hodiny ±5 minut při teplotě 2-8 °C (destičkou netřepejte).
9. Odstraňte těsnění destiček. Vyprázdněte jamky a třikrát je promyjte s použitím nejméně 300 µl studeného promývacího pufru (2-8 °C) na jamku. Vyprázdněte jamky a pevně udeřte destičkou na blotovací papír.
Poznámka: Roztok substrátu TMB upravte na pokojovou teplotu (18-28 °C).
10. Do každé jamky přidejte 100 µl roztoku substrátu TMB.
11. Přikryjte destičku těsnicím prostředkem a inkubujte ji na orbitální třepačce při 400-600 otáčkách za minutu po dobu 30 ±2 minut při teplotě 18-28 °C. Chraňte destičku před přímým světlem.
12. Do všech jamek přidejte 100 µl stop roztoku. Do 30 minut přejděte ke kroku 13.
13. Odečtěte absorbanci při 450 nm ve čtečce mikrotitračních destiček.

KONTROLA KVALITY

Dobrá znalost tohoto návodu k použití je nezbytná pro získání spolehlivých výsledků. Ty lze získat pouze za použití přesných laboratorních technik (platné směrnice SLP) a přesného dodržování návodu k použití. Protože není komerčně dostupné kontrolní sérum pro antigangliosidové protilátky, doporučujeme použít pozitivní a negativní sérum pro interní kontrolu kvality. Pro kalibrátor se doporučuje minimální hodnota OD 1,2. Všechny kontroly musí být ve stanoveném očekávaném rozmezí (% poměr). Očekávané rozsahy kontrol jsou specifické pro danou šarži a jsou uvedeny v listu s údaji o kontrole kvality. Výkonnostní charakteristiky by měly být ve stanovených mezích. Pokud tyto charakteristiky nejsou v souladu se stanovenými limity a opakování vylučuje selhání při manipulaci, zkontrolujte následující otázky: i) Byly všechny reagencie použity v krocích 3-10 uchovávány při teplotě 2-8 °C? ii) přesnost pipet, teploměrů a časovačů, iii) nastavení podložky ELISA a čtečky, iv) datum expirace reagencií v) podmínky skladování a inkubace vi) barva roztoku substrátu TMB (měla by být bezbarvá) a vii) čistota vody.

STANDARDIZACE

Kalibrátor obsažený v této sadě byl kalibrován podle interního referenčního materiálu. Byl nastaven na 100 % poměr.

VÝSLEDKY A VÝPOČET

Výpočet výsledků:
1. Zaznamenejte absorbanci (OD) při 450 nm pro každou jamku (kalibrátor, kontroly a vzorky pacientů).
2. Zprůměrujte duplicitní hodnoty kalibrátoru a kontrol (pokud jsou k dispozici).
3. Výsledky jsou vyjádřeny jako poměr absorbance vzorků a (zprůměrované) absorbance kalibrátoru.

Směs izotypů IgG/IgM

$$\text{Poměr \%} : \frac{\text{absorbance vzorků nebo kontrol}}{\text{absorbance kalibrátoru}} \times 200$$

Izotypy IgG a IgM

$$\text{Poměr \%}: \frac{\text{absorbance vzorků nebo kontrol}}{\text{absorbance kalibrátoru}} \times 100$$

Programy pro výpočet výsledků jako % poměru jsou k dispozici na většině čteček mikrodestiček.
Poznámka: Výsledky uvedené v tabulkách 7 a 8 jsou příklady. Kalibrátor a kontroly musí být použity v každé jednotlivé analýze.

OMEZENÍ

1. Doporučuje se, aby šedá zóna a pozitivní výsledky získané pomocí směsi enzymových značek IgG/IgM byly před dalším stanovením izotypu pomocí jednotlivých enzymových značek IgG a IgM nejprve projednány s klinickým lékařem/referujícím neurologem.
2. V klinické literatuře byly popsány pouze izotypy autoprotilátek IgM proti "MAG" a IgM proti GM2 (ref. 1, 2, 6, 7).
3. Šedé zóny a pozitivní výsledky pro epitop "MAG" získané pomocí směsi enzymového značení IgG/IgM nebo enzymového značení IgM mohou být znovu testovány pomocí BÜHLMANN anti-MAG autoprotilátek ELISA (EK-MAG).
4. Autoprotilátky IgM proti GD1a jsou velmi vzácné a bylo prokázáno, že nemají primární klinický význam (ref. 1, 2, 6, 7).
5. Dominantní autoimunitní reakce mohou být doprovázeny zkříženou reaktivitou s jinými vyšetřovanými gangliosidy. Tato zkřížená reaktivita obvykle vykazuje vysoké odchylky mezi jednotlivými testy a může být klinicky nerelevantní. Interpretace výsledků by proto měla být prováděna pouze společně s odborníkem/specialistou.
6. Vzhledem k polyreaktivitě autoimunitních protilátek (ref. 6) a rozdílům v geografické prevalenci by výsledky testů měly být použity pouze k podpoře klinické interpretace neuropatie odborníkem/specialistou v kombinaci s klinickým obrazem pacienta.
7. BÜHLMANN GanglioCombiTM MAG ELISA nebyl validován pro vzorky z plazmaferézy.

Případná odpovídající omezení jsou označena čísly v horním indexu.

	Izotyp: IgG/IgM Mix[1]		
Kategorie titru / Poměr (%)	**<30**	**30-50**	**>50**
"MAG"	Negativní	Viz omezení[2,3]	Viz omezení[2,3]
GM1		Později přetestovat	Pozitivní
GM2		Viz omezení[2,4]	Viz omezení[2,4]
GD1a			
GD1b		Později přetestovat	Pozitivní
GQ1b			

Tab.3

	Izotyp: IgG		
Kategorie titru / Poměr (%)	**<30**	**30-50**	**>50**
"MAG"	Negativní	Viz omezení[2]	Viz omezení[2]
GM1		Později přetestovat	Pozitivní
GM2		Viz omezení[2]	Viz omezení[2]
GD1a		Později přetestovat	Pozitivní
GD1b			
GQ1b			

Tab.4

	Izotyp: IgM		
Kategorie titru / Poměr (%)	**<30**	**30-50**	**>50**
"MAG"	Negativní	Viz omezení[3]	Viz omezení[3]
GM1		Později přetestovat	Pozitivní
GM2			
GD1a		Viz omezení[4]	Viz omezení[4]
GD1b		Později přetestovat	Pozitivní
GQ1b			

Tab. 5

Ve spolupráci s níže uvedenými institucemi byla stanovena hranice 50 %. Hodnoty < 30 % byly jednoznačně klasifikovány jako negativní. Stanovené kategorie titru vycházejí z n = 100 normálních dárců krve 1 (dospělí muži a ženy ≤ a ≥ 50 let) a n = 277 patologických vzorků 2. Séra byla vyšetřena na přítomnost autoprotilátek proti každému z pěti gangliosidů (GM1, GM2, GD1a, GD1b a GQ1b) s detekcí enzymového značení IgG, IgM nebo IgG/IgM a na přítomnost autoprotilátek proti MAG s detekcí enzymového značení IgM podle postupu vyšetření. Výsledky normálních dárců krve jsou uvedeny v tabulce 18.

Pokyny pro použití cut-off a titrační kategorie / poměry (%):

Klinická interpretace	**Kategorie titru / Poměr (%)**
Negativní	<30
Šedá zóna	30-50
Cut-off	50
Pozitivní	>50-100
Silně pozitivní	>100

Tab. 6

[1] získaný od místní odběrové služby, CH
[2] získány z Friedrich-Baur-Institute, Ludwig-Maximilians-University of Munich, DE; University Hospital, Basel, Department of Neurology, CH; Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Lyon Sud; Department of Neurology, University of Lyon, FR

VÝKONNOSTNÍ CHARAKTERISTIKY

Přesnost v rámci testu (v sérii):

"MAG": 3,4-15,0 % CV **GM1: 1,4-5,7 % CV**
GM2: 2,0-14,2 % CV **GD1a: 1,5-7,7 % CV**
GD1b: 2,3-4,4 % CV **GQ1b: 2,6-5,2 % CV**

Pro každý z pěti gangliosidů nanesených na mikrotitračních destičkách byly vybrány dvě anti-gangliosid pozitivní séra. Vzorky séra byly testovány ve dvanácti opakováních v jednom cyklu pro každou z enzymových značek: IgG/IgM Mix, IgG a IgM s jednou šarží reagencií. Pro syntetický epitop "MAG" potažený na mikrotitrační destičce byla vybrána čtyři anti-MAG pozitivní séra, která byla testována ve dvanácti opakováních v jednom cyklu s enzymovou značkou IgM se dvěma šaržemi reagencií. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 9, 10, 11 a 12.

Přesnost mezi testy (mezi jednotlivými testy):

"MAG": 5,6-15,1 % CV **GM1: 9,0-21,0 % CV**
GM2: 5,0-16,5 % CV **GD1a: 11,1-24,1 % CV**
GD1b: 8,0-13,2 % CV **GQ1b: 8,2-19,6 % CV**

Pro každý z pěti gangliosidů nanesených na mikrotitračních destičkách byly vybrány dvě anti-gangliosid pozitivní séra. Vzorky sér byly testovány v jednotlivých opakováních ve 20 nezávislých sériích, přičemž pro každou z enzymových značek byla provedena jedna série denně: IgG/IgM Mix, IgG a IgM. Pro syntetický epitop "MAG" nanesený na mikrotitrační destičku byla vybrána čtyři anti-MAG pozitivní séra, která byla testována ve dvou opakováních v deseti nezávislých sériích s jednou sérií denně s enzymovou značkou IgM. Studie přesnosti mezi testy byly provedeny s jednou šarží reagencie. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 13, 14, 15 a 16.

Mez slepého blanku (LoB): poměr ≤6,1 %.

LoB byla stanovena podle pokynu CLSI EP17-A. Pro všechny tři enzymové značky bylo v jedné sérii provedeno dvanáct slepých opakování (inkubační pufr) pro každý gangliosid: IgG/IgM Mix, IgG a IgM. Protože testování autoprotilátek MAG lze interpretovat pouze v kontextu detekce IgM, byl epitop "MAG" testován pouze s enzymovou značkou IgM. Mez slepého blanku (LoB), vyjádřená jako % poměr k absorbanci kalibrátoru, byla vypočtena na ≤6,1 % pro enzymovou značku IgG/IgM Mix, ≤3,5 % pro enzymovou značku IgG a ≤5,3 % pro enzymovou značku IgM. Nejvyšší hodnota LoB získaná při použití tří různých enzymových značek byla vzata pro stanovení celkové meze slepého pokusu (LoB). LoB byla vypočtena pomocí parametrické analýzy.

Mez detekce (LoD): poměr ≤8,1 %.

LoD byla stanovena podle pokynu CLSI EP17-A. Pro každý z pěti gangliosidů i syntetický "MAG" potažený na mikrotitrační destičce byl vybrán jeden klinický vzorek představující nízkou koncentraci protilátek. Vzorky s nízkou hladinou byly měřeny ve dvanácti opakováních v jednom cyklu pro každou ze tří enzymových značek: IgG/IgM Mix, IgG a IgM. Protože testování autoprotilátek MAG lze interpretovat pouze v kontextu detekce IgM, byl epitop "MAG" testován pouze s enzymovou značkou IgM. LoD, vyjádřená jako % poměr k absorbanci kalibrátoru, byla vypočtena na ≤8,1 % pro enzymové značení IgG/IgM Mix, ≤6,3 % pro enzymové značení IgG a ≤6,9 % pro enzymové značení IgM. Pro stanovení celkového limitu detekce (LoD) byla použita nejvyšší hodnota LoD získaná při použití tří různých enzymových značek.

Funkční citlivost: poměr ≤8,1 %

Hodnoty přesnosti získané pro vzorky séra ve studii mezi testy byly zaneseny do grafu proti jejich průměrným hodnotám % poměru. Na datové body byl aplikován kubický polynomický fit pro získání profilu přesnosti. Jelikož nebyl pozorován průsečík jednostranného 95 % intervalu spolehlivosti fitování s 20 % kritériem přijatelnosti CV, byla funkční citlivost stanovena jako rovna LoD. Výsledky jsou shrnuty na obrázku 2.

Linearita

Lineární rozsah testu BÜHLMANN GanglioCombiTM MAG ELISA byl stanoven podle pokynu CLSI EP06-A. Bylo použito více sér s koncentracemi v celém měřicím rozsahu testu, což umožnilo vyhodnotit většinu kombinací gangliosidů a enzymových značek. Vzorky séra byly naředěny podle návodu k použití. V případě vysoce pozitivních vzorků séra bylo použito vyšší ředění 1:2000. Následně byly z každého vzorku připraveny série ředění po 10 % s použitím inkubačního pufru jako ředidla. Linearita byla definována jako interval, ve kterém byl relativní rozdíl mezi lineárním a, pokud byl významný, polynomickým fitem vyššího řádu nižší než 20 %. Pro poměry ≤ 25 % byl povolen absolutní rozdíl pod 5 % poměru. Pro všech pět gangliosidů nanesených na mikrotitrační destičku byl potvrzen lineární rozsah pokrývající a překračující kategorie titru BÜHLMANN GanglioCombiTM MAG ELISA: <30 % - negativní; 30-50 % - šedá zóna; 50-100 % pozitivní a >100 % silně pozitivní. Pro syntetický epitop "MAG" byla zjištěna horní hranice lineárního rozsahu 75 % poměru v rámci kategorie pozitivního titru. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 17.

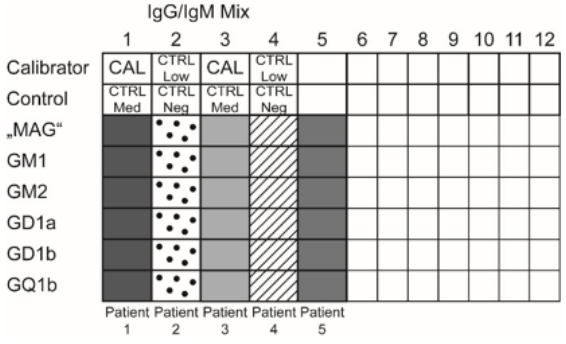
Srovnání metod pro MAG "mimotop":

Anti-MAG autoprotilátky ELISA (EK-MAG): κ = 0,85 Anti-SGPG autoprotilátky ELISA (EK-SGPG): κ = 0,77
Osmdesát (80) klinických vzorků séra se signály autoprotilátek anti-MAG IgM v celém rozsahu měření bylo vyšetřeno v jednotkách s detekcí IgM enzymovou značkou na mikrotitračních destičkách potažených "MAG" a testem anti-MAG autoprotilátek ELISA (EK-MAG) a anti-SGPG autoprotilátek ELISA (EK-SGPG). Měření byla provedena pomocí dvou šarží mikrotitračních destiček potažených "MAG". Výsledky byly analyzovány pomocí statistiky Kappa. Korelační údaje jsou znázorněny na obrázcích 3A a 3B.

INTERFERUJÍCÍ LÁTKY

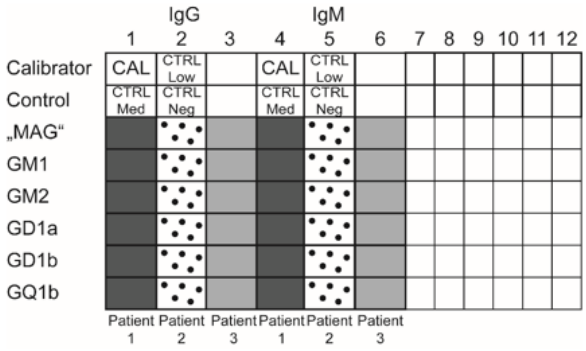
Žádná interference není zjištěna u následujících látek až do následujících koncentrací: nekonjugovaný bilirubin (iktherická séra): 40 mg/d; konjugovaný bilirubin (iktherická séra): 60 mg/dl; hemoglobin: 400 mg/dl; hemolyzát (hemolyzovaná krev): 400 mg/dl a triglyceridy (Intralipid®): 2000 mg/dl.

Mikrotitrační destičky nastevení: IgG/IgM-Mix štítek



Obr. 1A: ≤ 24 pacientů / Kit (2 MP / Kit)

Mikrotitrační destičky nastavení: IgG & IgM štítky



Obr. 1B: 2 profilů / pacient, ≤ 12 pacientů / Kit (2 MP / Kit)

Příklad výsledků

B IgG & IgM štítky

Enzymový štítek	Absorbance (OD450)		Poměr [%]		Kategorie	
B-GCO-ELG/ B-GCO-ELM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
Kalibrátor	1.789	2.576				
	1.833	2.527				
Kalibrátor prům.	1.836	2.551	100	100		
Střední kontrola	1.267	1.743	69	68		
	1.237	1.764	67	69		
Stř.kontr.prům.	1.252	1.753	68	69		
Nízká kontrola	0.567	0.938	30	37		
	0.584	0.942	32	37		
Nízká kontr.prům.	0.571	0.940	31	37		
Neg.kontrola	0.061	0.098	3	4		
	0.051	0.095	3	4		
Neg. kontrola prům.	0.056	0.097	3	4		
Vzorek 1 “MAG”	0.532	0.208	29	8	Nere-levantní	Neg.
Vzorek 1 GM1	0.171	3.814	9	150	Neg.	Silně poz.
Vzorek 1 GM2	0.116	0.095	6	37	Neg.	Šedá zóna
Vzorek 1 GD1a	1.117	0.574	61	23	Poz.	Neg.
Vzorek 1 GD1b	1.021	0.354	56	14	Poz.	Neg.
Vzorek 1 GQ1b	0.378	0.208	21	8	Neg.	Neg.

Tab. 8

Příklad výsledků

A IgG/IgM-Mix štítek

B-GCO-ELGM	Absorbance (OD450)	Poměr [%]	Výsledek/ Návrh
Kalibrátor	1.415		
	1.445		
Kalibrátor prům.	1.430	200	
Stř.kontrola	0.498	69	
	0.482	67	
Stř.kontrola prům.	0.490	68	
Nízká kontrola	0.195	27	
	0.191	26	
Nízká kontr.prům.	0.193	27	
Negativní kontrola	0.090	12	
	0.100	14	
Neg. kontr.prům.	0.095	13	
Vzorek 1 "MAG"	0.300	42	Přetestováno EK-MAG
Vzorek 1 GM1	0.544	76	Pozitivní
Vzorek 1 GM2	0.106	15	Negativní
Vzorek 1 GD1a	0.162	45	Šedá zóna
Vzorek 1 GD1b (w	0.745	104	Silně pozitivní
Vzorek 1 GQ1b	0.090	13	Negativní

Tab. 7

Intra-Assay přesnost (v rámci běhu)

Enzymový štítek IgM: syntetický "MAG"								
	Lot L15AB				Lot L24AD			
Vzorek	**1**	**2**	**3**	**4**	**1**	**2**	**3**	**4**
Prům. [Poměr]	65.8	78.9	155.0	152.9	68.6	88.4	182.6	171.1
SD [Poměr]	4.5	7.6	5.2	7.3	10.3	7.2	17.2	19.4
CV [%]	**6.9**	**9.6**	**3.4**	**4.7**	**15.0**	**8.2**	**9.4**	**11.3**

Tab. 9

Enzymový štítek IgG/ IgM										
Ganglio strany	**GM1**	**GM1**	**GM2**	**GM2**	**GD1a**	**GD1a**	**GD1b**	**GD1b**	**GQ1b**	**GQ1b**
Vzorek	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Prům. [Poměr]	86	156	72	192	124	264	110	310	286	84
SD [Poměr]	1.2	2.5	5.2	1.2	4.8	2.0	2.0	4.0	4.6	1.9
CV [%]	**2.9**	**3.2**	**14.2**	**1.2**	**7.7**	**1.5**	**3.6**	**2.6**	**3.2**	**4.5**

Tab. 10

Přesnost mezi testy (v rámci běhu)

Enzymový štítek IgG										
Ganglio strany	**GM1**	**GM1**	**GM2**	**GM2**	**GD1a**	**GD1a**	**GD1b**	**GD1b**	**GQ1b**	**GQ1b**
Vzorek	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Prům. [Poměr]	59	82	49	115	72	153	139	111	89	222
SD [Poměr]	1.6	4.7	1.8	6.9	4.4	7.2	4.0	2.8	4.5	5.8
CV [%]	**2.7**	**5.7**	**3.7***	**6.0***	**6.1**	**4.7**	**2.9**	**2.5**	**5.1**	**2.6**

Tab. 11

Enzymový štítek IgM										
Ganglio strany	**GM1**	**GM1**	**GM2**	**GM2**	**GD1a**	**GD1a**	**GD1b**	**GD1b**	**GQ1b**	**GQ1b**
Vzorek	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Prům. [Poměr]	79	87	43	152	122	103	56	142	72	74
SD [Poměr]	1.8	1.2	0.9	4.8	3.6	3.9	2.5	3.3	3	2.6
CV [%]	**2.3**	**1.4**	**2.0**	**3.1**	**3.0****	**3.8****	**4.4**	**2.3**	**5.2**	**3.5**

Tab. 12

Přesnost mezi testy (mezi běhy)

Enzymový štítek IgM: syntetický "MAG"				
	Lot 3317N			
Vzorek	**1**	**2**	**3**	**4**
Prům. [Poměr]	106.0	115.1	176.1	173.6
SD [Poměr]	11.7	17.4	12.6	9.7
CV [%]	**11.0**	**15.1**	**7.1**	**5.6**

Tab. 13

Enzymový štítek IgG/IgM										
Ganglio strany	**GM1**	**GM1**	**GM2**	**GM2**	**GD1a**	**GD1a**	**GD1b**	**GD1b**	**GQ1b**	**GQ1b**
Vzorek	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Prům. [Poměr]	74	184	138	176	224	92	96	306	92	262
SD [Poměr]	3.5	13.9	11.3	7.8	14.2	7.5	4.8	13.4	3.8	13.3
CV [%]	**9.5**	**15.2**	**16.5**	**8.9**	**12.7**	**16.2**	**10.1**	**8.8**	**8.2**	**10.1**

Tab. 14

Přesnost mezi testy (mezi běhy)

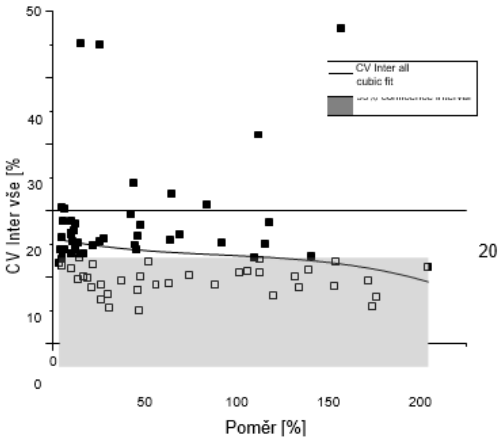
Enzymový štítek IgM										
Ganglio sides	**GM1**	**GM1**	**GM2**	**GM2**	**GD1a**	**GD1a**	**GD1b**	**GD1b**	**GQ1b**	**GQ1b**
Vzorek	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Prům. [Poměr]	102	63	47	120	112	65	154	46	171	63
SD [Poměr]	10.9	5.7	2.4	8.8	35.2	14.6	19.1	3.7	16.2	9.9
CV [%]	**10.7**	**9.0**	**5.0**	**7.3**	**31.5****	**22.6****	**12.4**	**8.0**	**9.5**	**15.6**

Tab. 16

*Kombinace autoprotilátek a izotypů, které nebyly popsány v literatuře, nebyly do konečné analýzy zahrnuty.

**Kombinace autoprotilátka/izotyp, u nichž nebyl prokázán primární klinický význam, nebyly do konečné analýzy zahrnuty.

Funkční senzitivita



Obr. 2

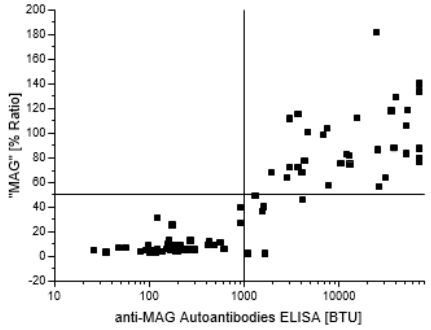
Enzymový štítek IgG										
Ganglio strany	GM1	GM1	GM2	GM2	GD1a	GD1a	GD1b	GD1b	GQ1b	GQ1b
Vzorek	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Prům. [Poměr]	52	84	45	118	44	139	109	140	42	204
SD [Poměr]	6.4	17.6	6.4	21.5	10.6	15.5	14.2	18.5	8.3	23.6
CV [%]	**12.4**	**21.0**	**14.1***	**18.2***	**24.1**	**11.1**	**13.0**	**13.2**	**19.6**	**11.6**

Tab. 15

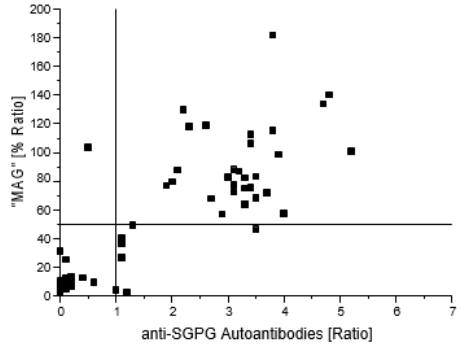
Ganglio-strany	Enzymový štítek	Sérum	Měřený rozsah	Lineární rozsah
"MAG"	IgM	Reg 83	3-81	3-75
		Reg 54	22-57	22-57
GM1	IgG	SP69	7-94	7-94
		P II	9-181	17-175
		JJ	6-127	6–127
	IgM	SP69	10-93	21-79
		SM1	14-148	26-114
			9-138	9-89
			16-173	30-128
	Mix	P II	16-302	16-302
		SP69	14-218	22-178
GM2	IgM	RL1739	8-110	13-102
GD1a	IgG	EP4076	4-88	4-88
	IgM	68-MA	14-111	14-111
		MS	7-106	17-103
GD1b	IgG	581-SP	5-99	5-99
	IgM	72 BR	14-163	14-148
	Mix	581-SP	18-264	18-176
			12-198	34-166
GQ1b	IgG	MG	18-228	18-228

Tab 17

Metoda srovnání pro MAG "mimotop"



Obrázek 3A: Vodorovná čára označuje 50 % hranici poměru použitou v testech BÜHLMANN GanglioCombiTM ELISA. Svislá čára označuje mezní hodnotu 1000 BTU použitou v testu ELISA na autoprotilátky proti MAG.



Obrázek 3B: Vodorovná čára označuje 50 % hranici poměru použitou v testech BÜHLMANN GanglioCombiTM ELISA. Svislá čára označuje mezní hodnotu 1 použitou v testu anti-SGPG Autoantibody ELISA.

Normální dárci krve

Kategorie	anti-Ganglioside a MAG autoantibodies (%)
	MAG, GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b
Negativní	91-100
Šedá zóna	0-6
Pozitivní	0-4
Silně pozitivní	0

Tab. 18

Frekvence distribuce jednotlivých antigangliosidových a MAG autoprotilátek (%) u normálních dárců krve (n = 100) detekovaných pomocí BÜHLMANN GanglioCombiTM MAG ELISA testu, rozdělených do kategorií titru. Výsledky zobrazují hodnoty pro jednotlivé gangliosid-izotypy (směs IgG/IgM, IgG nebo IgM) a kombinace MAG-IgM.

REFERENCE

1. Willison HJ and Yuki N: *Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies.* Brain 125, 2591-2625 (2002).
2. Latov N: *Diagnosis and treatment of chronic acquired demyelinating polyneuropathies.* Nature Reviews Neurology 10, 435-446 (2014).
3. Burns TM and Mauermann ML: *The Evaluation of Polyneuropathies.* Neurology Clinical Practice 76, 6-13 (2011).
4. Stork ACJ et al. *Prevalence, specificity and functionality of anti-ganglioside antibodies in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy*. Journal of Neuroimmunology 268, 89-94 (2014).
5. Humbel RL and Schmit P: *Anticorps antigangliosides et neuropathies peripheriques*. Rev Med Liege 51, 368- 375 (1996).
6. Bourque P R et al. *Autoimmune peripheral neuropathies.* Clin Chim Acta 449, 37-42 (2015)
7. Delmont E and Willison H: *Diagnostic Utility of Auto Antibodies in Inflammatory Nerve Disorders*; J of Neuromuscular Diseases 2, 107-112 (2015)

KRÁTKÝ PROTOKOL

BÜHLMANN GanglioCombi™ MAG ELISA

Potažená mikrotitrační destička

↓ ↺ *promýt 2 x*

100 µL kalibrátor, kontroly nebo vzorky séra (1:50)

↓ ↺ *inkubovat 2h ±5 min při 2-8 °C*
↺ *promýt 3 x*

přidat 100 µL Enzymového štítku

↓ ↺ *inkubovat 2h ±5 min při 2-8 °C*
↺ *promýt 3 x*

přidat 100 µL TMB substrátu

↓ ↺ *inkubovat 30 min ±2 min při 18-28 °C na desce rotátoru*

přidat 100 µL zastavovacího roztoku

➡ **Odečíst absorbanci při 450 nm (během 30 minut)**

CELKOVÝ ČAS: 4.5h