anti-MAG Antibodies ELISA

MAG = Glicoproteina associata alla mielina

Per uso diagnostico *in vitro*

EK-MAG 96 test

Data di pubblicazione: 2023-05-31
Versione A2

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

ITALIANO

USO PREVISTO

Anti-MAG Antibodies ELISA è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgM anti-MAG in campioni di siero umano. Il test è inteso come strumento ausiliare per la diagnosi di neuropatia anti-MAG e va utilizzato insieme ad altre evidenze cliniche e di laboratorio.

Solo per uso di laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test anti-MAG Antibodies ELISA permette di misurare gli anticorpi IgM contro la glicoproteina associata alla mielina (MAG) nel siero utilizzando la tecnica ELISA a sandwich. La piastra per microtitolazione è rivestita di MAG purificata ottenuta da cervello umano. Il siero del paziente, i controlli e i calibratori vengono aggiunti ai pozzetti della piastra per microtitolazione. Dopo 2 ore di incubazione a 2 – 8 °C e i passaggi di lavaggio, un anticorpo di rilevazione coniugato con perossidasi di rafano (HRP) rileva gli anticorpi anti-MAG legati alla MAG umana sulla piastra. Dopo altre 2 ore di incubazione e altri passaggi di lavaggio si aggiunge il substrato cromogenico della HRP, la tetrametilbenzidina (TMB) che determina la formazione di colore blu, quindi la reazione viene bloccata e il suo colore vira al giallo. L'assorbanza è misurata alla lunghezza d'onda di 450 nm. Il livello di anticorpi anti-MAG viene calcolato per interpolazione dalla curva di calibrazione ottenuta dalla misurazione dei calibratori ed è espresso in unità di titolo BÜHLMANN (BTU).

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Reagente	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropiastra 96 pozzetti prerivestiti con MAG umana	12 strisce da 8 pozzetti con supporto	B-MAG-MP	Pronto all'uso
Foglio sigillante per piastre	3 pezzi	-	Pronto all'uso
Tampone di lavaggio concentrato (10x)	1 flacone da 100 mL	B-MAG-WB	Diluire con 900 mL di acqua deionizzata
Tampone di incubazione con conservanti	1 flacone da 100 mL	B-MAG-IB	Pronto all'uso
Calibratori da A a D[1] liofilizzati con conservanti	4 fiale	B-MAG-CASET	Aggiungere 1 mL di tampone di incubazione
Controllo basso e alto [2] liofilizzati con conservanti	2 fiale	B-MAG-CONSET	Aggiungere 1 mL di tampone di incubazione
Marcatore enzimatico IgM anticorpo anti-IgM umane coniugato con HRP in una matrice tampone con conservanti	1 fiala da 11 mL	B-MAG-ELM	Pronto all'uso Soluzione blu
Substrato TMB TMB in tampone citrato	1 fiala da 11 mL	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione di stop Acido solforico 0,25 M	1 fiala da 11 mL	B-STS	Pronto all'uso **Agente corrosivo**

Tabella 1

[1] Dopo la ricostituzione, i calibratori A, B, C e D contengono rispettivamente 70000, 15000, 3000 e 1000 unità di titolo BÜHLMANN (BTU) di anticorpi anti-MAG.

[2] I controlli contengono quantità lotto-specifiche di anticorpi anti-MAG. Per i livelli effettivi, consultare la scheda dati-QC aggiuntiva.

CONSERVAZIONE E VALIDITA DEI REAGENTI

Reagenti sigillati / non aperti	
Conservare a 2-8 °C. Non usare i reagenti dopo la data di scadenza stampata sulle etichette.	
Reagenti aperti / ricostituiti	
Micropiastra	Riporre subito le strisce di pozzetti non utilizzate dentro la busta di alluminio contenente l'essiccante e risigillarla premendo lungo tutta la chiusura ermetica. Conservare a 2-8 °C per un periodo massimo di 5 mesi.
Tampone di lavaggio diluito	Conservare a 2-8 °C per un periodo massimo di 5 mesi.
Tampone di incubazione	
Marcatore enzimatico IgM	
Substrato TMB	
Controlli	Aliquotare dopo la ricostituzione e conservare a ≤-20 °C. Conservare a ≤-20 °C per un periodo massimo di 5 mesi.[1]
Calibratori	
Soluzione di stop	Conservare a 18-28 °C per un periodo massimo di 5 mesi.

Tabella 2

[1] I calibratori e i controlli ricostituiti possono essere sottoposti a tre cicli di congelamento-scongelamento durante questi 5 mesi.

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

- Pipettatori di precisione con puntali monouso: da 10 µL, 20 µL, 100 µL, e 1000 µL
- Provette di polistirene o polipropilene monouso per la preparazione delle diluizioni dei campioni
- Cilindro da 1000 mL per la diluizione del tampone di lavaggio
- Sistema di lavaggio per micropiastre
- Carta assorbente
- Agitatore di micropiastre
- Lettore di micropiastre per misurare l'assorbanza a 450 nm

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Precauzioni per la sicurezza

- I calibratori, i controlli e la micropiastre di questo kit contengono componenti di origine umana. Sebbene i reagenti siano stati testati per HBV, HCV e HIV1/2 e siano risultati negativi, vanno considerati come potenziali vettori di infezioni e quindi maneggiati secondo le buone pratiche di laboratorio (GLP) adottando le precauzioni del caso.
- I componenti contenuti in questo kit sono classificati conformemente al regolamento (CE) n. 1272/2008:
  - La soluzione di stop contiene acido solforico (conc. 2,5-5%), pertanto i reagenti possono provocare irritazione cutanea (H315), grave irritazione oculare (H319) ed essere corrosivi per i metalli (H290).
  - I calibratori e i controlli contengono gentamicina solfato (polvere) per cui i reagenti possono provocare una reazione allergica cutanea (H317) e sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalati (H334). Contengono, inoltre, tiomersale (polvere) per cui il reagente è mortale se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato (H300+H310+H330).
  - Il tampone di incubazione e il tampone di lavaggio contengono Triton™ X-100 (polietilenglicole terz-ottilfenil etere, conc. < 1%), per cui i reagenti provocare grave irritazione oculare (H319).
  - Il marcatore enzimatico contiene Triton™ X-100 (polietilenglicole terz-ottilfenil etere, conc. < 1%), per cui i reagenti provocare grave irritazione oculare (H319). Contiene, inoltre, gentamicina solfato (conc. < 1%) per cui i reagenti possono provocare una reazione allergica cutanea (H317).
- Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi, la pelle o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare con abbondante acqua; in caso contrario possono manifestarsi irritazione/ustioni.
- I reagenti e le sostanze chimiche devono essere trattati come rifiuti pericolosi in conformità con le linee guida o le normative nazionali in materia di sicurezza dei materiali a rischio biologico.

Precauzioni tecniche

- Prima di eseguire il test leggere attentamente le istruzioni. Le prestazioni del test risultano negativamente compromesse quando i reagenti vengono diluiti in modo scorretto, modificati o conservati in condizioni diverse rispetto a quelle specificate in queste istruzioni per l'uso.

Procedura del test ELISA

Temperatura dei reagenti

- Preparare i reagenti prima di iniziare la procedura analitica. Passaggi 3-9: I reagenti usati nei passaggi 3-9 devono essere freddi (2-8 °C) e mantenuti freddi durante la pipettatura e il lavaggio. Raccomandazione: preparare il tampone di lavaggio il giorno prima dell'esecuzione del test e metterlo in frigorifero per tutta la notte.
- Effettuare tutti i passaggi di lavaggio con tampone di lavaggio freddo (2-8 °C).
- Portare il substrato TMB e la soluzione di stop a temperatura ambiente (18-28 °C) all'inizio della procedura analitica.

Passaggi di lavaggio

- I passaggi di lavaggio 3, 6 e 9 sono fondamentali per rimuovere residui derivanti dal processo di produzione e/o, potenzialmente, anticorpi non legati presenti nei pozzetti.
- È vivamente raccomandato usare la "modalità piastra" di un sistema di lavaggio automatico, cioè ogni fase della procedura (erogazione/aspirazione) viene eseguita in sequenza su tutte le strisce prima che lo strumento prosegua con il ciclo di lavaggio successivo.
- Assicurarsi che tutti i pozzetti siano completamente vuoti dopo l'ultimo ciclo di lavaggio.

Incubazione del substrato

- Passaggio 11: Agitare le piastre per microtitolazione durante l'incubazione con il substrato. A seconda del modello di agitatore per piastre, consigliamo 400-600 rpm. La soluzione deve muoversi nei pozzetti ma non fuoriuscire.

Diluizione supplementare dei campioni

- I campioni che superano 70000 BTU possono essere diluiti per farli rientrare nell'intervallo di misurazione analitico (>1000 BTU, <70000 BTU). Usare il tampone di incubazione per la diluizione dei campioni di siero.

Componenti del kit

- Non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza stampata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti di lotti diversi.
- Adottare tutte le precauzioni possibili per evitare contaminazioni incrociate tra i reagenti, i campioni o tra i pozzetti.
- I micropozzetti non possono essere riutilizzati.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La procedura richiede rispettivamente <0,1 mL di sangue o <50 µL di siero.

Prelevare il sangue in provette semplici per prelievo venoso senza alcun additivo, evitando l'emolisi. Preparare il siero seguendo le istruzioni del fabbricante. Far decantare il siero.

I campioni di siero possono essere conservati a 2-8 °C per non più di 16 giorni o a -20 °C per non più di 12 mesi. I campioni congelati devono essere scongelati e miscelati a fondo mediante agitazione delicata o capovolgimento prima dell'uso.
Consigliamo di preparare aliquote dei campioni di siero prima di congelarli al fine di evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.

PROCEDURA DEL TEST

Nota: portare il substrato TMB a temperatura ambiente (18-28 °C).

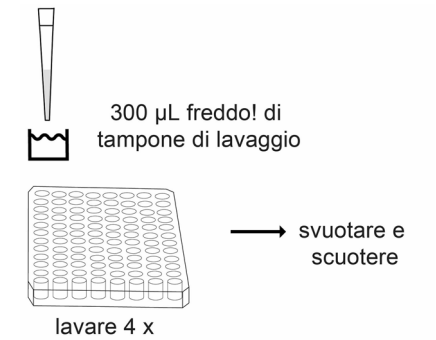
1. Diluire i campioni 1:1000 con tampone di incubazione. Usare, ad esempio, 2 µL di siero + 2000 µL di tampone di incubazione freddo! (2-8 °C). Miscelare a fondo

agitando su vortex e lasciare i campioni diluiti e i calibratori e i controlli ricostituiti a 2-8 °C per 30 minuti prima di pipettare (fare riferimento ai passaggi 4a - c).

2. Preparare un supporto per piastre con un numero sufficiente di strisce per testare il numero richiesto di calibratori, controlli e campioni. Staccare dal supporto le strisce in eccesso e risigillarlo immediatamente nella busta di alluminio insieme con l'essiccante. Conservare in frigorifero.

Nota: nei passaggi da 3 a 9 usare reagenti freddi.

3. Lavare i pozzetti quattro volte usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio freddo! (2-8 °C) per pozzetto. Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente per rimuovere completamente il liquido rimanente.



Nota: procedere immediatamente ai passaggi successivi.

4a. Pipettare 100 µL di tampone di incubazione (bianco) in duplicato e

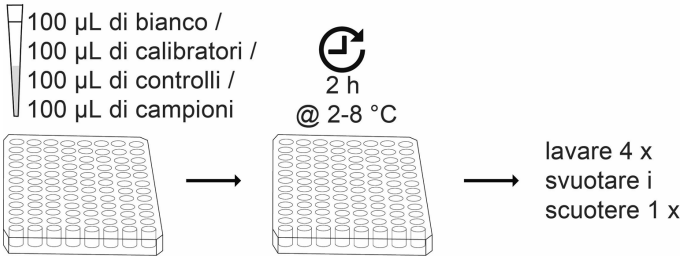
Pipettare 100 µL dei calibratori A-D in duplicato nei rispettivi pozzetti.

4b. Pipettare 100 µL dei controlli basso e alto in duplicato nei rispettivi pozzetti.

4c. Pipettare 100 µL di ogni campione diluito nei pozzetti successivi.

5. Coprire la piastra con un foglio sigillante e incubarla per 2 ore (±5 min) a 2-8 °C (non scuotere la piastra).

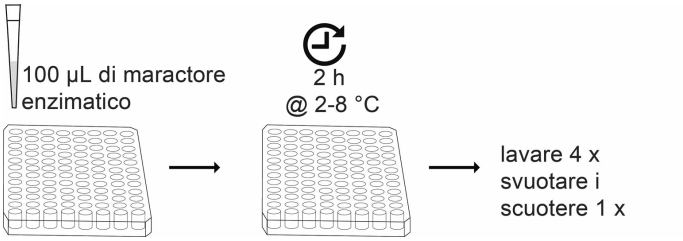
6. Togliere il foglio sigillante. Vuotare i pozzetti e lavarli quattro volte usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio freddo! (2-8 °C) per pozzetto. Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente per rimuovere completamente il tampone di lavaggio.



7. Aggiungere 100 µL di marcatore enzimatico IgM in tutti i pozzetti.

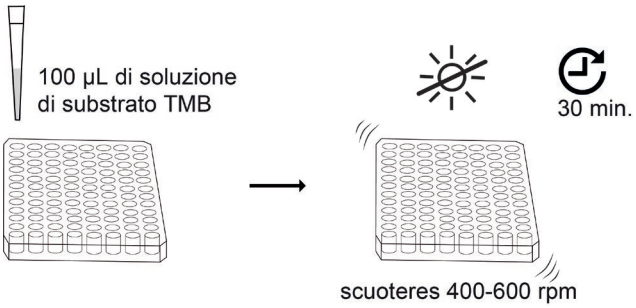
8. Coprire la piastra con un foglio sigillante e incubarla per 2 ore (±5 min) a 2-8 °C (non scuotere la piastra).

9. Togliere il foglio sigillante. Vuotare i pozzetti e lavarli quattro volte usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio freddo! (2-8 °C) per pozzetto. Vuotare i pozzetti e picchiettare con decisione la piastra sulla carta assorbente.



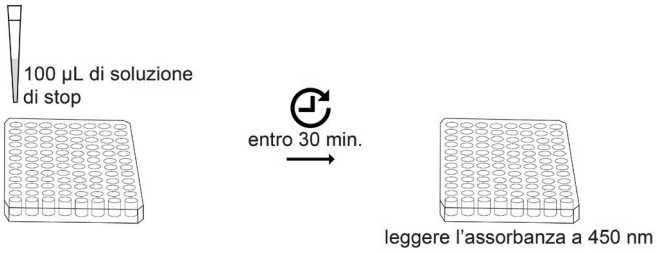
10. Aggiungere 100 µL di soluzione del substrato TMB (equilibrata a temperatura ambiente) in ogni pozzetto.

11. Coprire la piastra con un foglio sigillante, proteggerla dalla luce e incubarla su un agitatore per piastre impostato a 400-600 rpm a 18-28 °C per 30±2 minuti.



12. Aggiungere 100 µL di soluzione di stop in tutti i pozzetti. Rimuovere le bolle d'aria con un puntale per pipette. Procedere al passaggio 13 entro 30 minuti.

13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore di piastre per microtitolazione.



CONTROLLO DI QUALITA

Per un uso efficace del prodotto è necessaria un'approfondita comprensione di queste istruzioni per l'uso. Si otterranno risultati attendibili soltanto attraverso l'uso di tecniche di laboratorio precise e seguendo accuratamente queste istruzioni per l'uso.

Nel kit del test anti-MAG Antibodies ELISA sono inclusi due controlli: basso e alto. Ai controlli sono stati assegnati i range di valori indicati sulla scheda dati-QC allegata a ogni kit. Per ottenere risultati validi, le misurazioni dei controlli devono rientrare nei range dei valori indicati.

Oltre ai controlli del kit, consigliamo l'uso di combinazioni di sieri per il controllo qualità interno.

La riproducibilità dei parametri della curva standard e dei valori di controllo deve rientrare entro i limiti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. Se le prestazioni del test non soddisfano i limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) controllo della temperatura (conservazione a 2-8 °C dei reagenti usati nei passaggi 3-9); ii) precisione dei termometri e dei dispositivi di pipettatura e misurazione dei tempi; iii) impostazioni del lettore ELISA; iv) date di scadenza dei reagenti; v) condizioni di conservazione e di incubazione; vi) colore della soluzione del substrato TMB (deve essere incolore); vii) purezza dell'acqua; viii) metodi di aspirazione e lavaggio.

STANDARDIZZAZIONE E TRACCIABILITÀ METROLOGICA

Per la misurazione degli anticorpi anti-MAG in campioni di siero non sono disponibili materiali di riferimento riconosciuti a livello nazionale o internazionale né procedure di riferimento. Il test anti-MAG Antibodies ELISA è standardizzato rispetto a un materiale di riferimento stabilito internamente. I valori dei calibratori e dei controlli sono assegnati in base a un protocollo di trasferimento dei valori (rif. 1,2) per garantire la tracciabilità metrologica e sono indicati in unità di titolo BÜHLMANN arbitrarie. L'intervallo di confidenza al 95% dell'incertezza combinata dei calibratori del prodotto e dei controlli è inferiore al 35%.

CALCOLO DEI RISULTATI DEL TEST

Curva standard

Usare un programma software in grado di eseguire i seguenti calcoli:

- sottrazione del valore di OD del bianco da ogni pozzetto di calibratore per calcolare il valore dei calibratori.
- generazione della curva standard usando un adattamento logistico a 4 parametri (4 PL).

Controlli e campioni

Usare un programma software in grado di eseguire i seguenti calcoli:

- sottrazione del valore di OD del bianco da ogni pozzetto di controllo/campione. - calcolo del livello di anticorpi anti-MAG dei controlli/del campione in ogni pozzetto, in BTU, usando la curva standard generata.

Nota: i risultati presentati nella tabella 6 e nella figura 1 sono esempi e sono forniti solo a scopo dimostrativo. Per ogni serie di campioni da analizzare deve essere generata una nuova curva di calibrazione.

LIMITAZIONI

- Non esiste attualmente alcun metodo di riferimento accettato a livello internazionale per la rilevazione degli anticorpi IgM anti-MAG. Fare riferimento al capitolo "Standardizzazione e tracciabilità metrologica". I risultati devono essere interpretati usando i valori di cut-off indicati in queste istruzioni per l'uso.
- Questo test non è stato convalidato per il CSF e la plasmaferesi.
- Le immunoglobuline endovenose (IVIg) e le crioglobuline possono influenzare i risultati del test.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultato	Interpretazione
< cut-off	Risultato negativo
≥ cut-off	Risultato positivo (indica la presenza di anticorpi anti-MAG)

Tabella 3

I risultati del test devono essere interpretati congiuntamente alle informazioni ottenute dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO E CUT-OFF

L'intervallo di riferimento del test anti-MAG Antibodies ELISA è stato stabilito conformemente alle linee guida EP28-A3 del CLSI con 141 campioni di siero di soggetti apparentemente sani di età compresa tra 18 e 70 anni. I risultati sono riportati nella tabella 4.

Intervallo di riferimento [BTU]	
2,5° percentile (IC 90%)	97,5° percentile (IC 90%)
0 (0 - 0)	0 (0 - 988)

Tabella 4

Mille (1000) BTU è un valore di cut-off stabilito e usato negli studi pubblicati (rif. 5, 6, 9).
Nella letteratura scientifica (rif. 3, 4, 7, 8, tabella 13) sono anche stati usati valori di cut-off diversi e sono state proposte categorie di titolo per i risultati positivi dei test (rif. 10).

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le caratteristiche prestazionali sono basate sui risultati medi di 2 pozzetti.

Ripetibilità: 3,2 – 11,8% CV

Precisione intra-laboratorio: 5,5 – 15,9% CV

La ripetibilità e la precisione intra-laboratorio sono state determinate secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI usando il seguente disegno standardizzato: 20 giorni x 2 analisi x 2 replicati. Sono stati testati quattro (4) campioni aggregati di siero umano a copertura dell'intervallo di misurazione del test.
Un quinto campione negativo a 213 BTU ha fornito 79/80 risultati (98,8%) all'interno della categoria (< 1000 BTU). I risultati sono riassunti nelle tabelle 7 e 8.

Riproducibilità: CV 10,0 - 21,6%

La riproducibilità è stata determinata secondo le linee guida EP05-A3 del CLSI eseguendo le misurazioni con il seguente disegno: 3 operatori x 3 strumenti/lotti x 5 giorni x 5 replicati. Sono stati testati quattro (4) campioni aggregati di siero umano a copertura dell'intervallo di misurazione del test. Un quinto campione negativo a 55 BTU ha fornito 75/75 risultati (100,0%) all'interno della categoria (< 1000 BTU). I risultati sono riassunti nelle tabelle 9 e 10.

Limite di rilevabilità (LoD): 113 BTU

Il LoD è stato determinato secondo le linee guida EP17-A2 del CLSI con percentuali di falsi positivi (α) inferiori al 5% e di falsi negativi (β) inferiori al 5% basandosi su 120 determinazioni, con 60 replicati del bianco e 60 replicati con bassi livelli e un **limite del bianco (LoB) di 17 BTU**.

Effetto "hook" delle concentrazioni elevate

È possibile misurare campioni con livelli di anticorpi anti-MAG fino a $2{,}8*10^5$ BTU senza limitare il range di misurazione del test.

Reattività incrociata/Altre eziologie

La reattività incrociata di anti-MAG Antibodies ELISA è stata testata per campioni assegnati con una malattia autoimmune. Nella tabella 11 sono mostrati diversi tipi di malattie autoimmuni e la presenza di anticorpi associati.

Con anti-MAG Antibodies ELISA sono stati testati anche altri campioni con eziologie diverse, presentati nella tabella 12.

Tutti i campioni, tranne uno dei cinque campioni positivi per GD1b, erano al di sotto del valore di cut-off tecnico (1000 BTU).

PRESTAZIONI CLINICHE

Le prestazioni cliniche sono state valutate mediante metanalisi della letteratura scientifica sottoposta a revisione paritaria. Sette studi hanno riguardato le prestazioni cliniche di anti-MAG Antibodies ELISA nella diagnosi delle neuropatie associate a gammopatia monoclonale IgM (rif. 3-9). I risultati delle analisi e i dettagli degli studi sono forniti rispettivamente nella tabella 5 e nella tabella 13.

N. neuropatia	344
N. controlli	447
Sensibilità (IC 95%)	58,9% (47,2 – 69,6%)
Specificità (IC 95%)	98,2% (89,7 – 99,7%)
AUC ROC	0,75

Tabella 5

IC: intervallo di confidenza
AUC ROC: area sottostante la curva ROC (Receiver Operating Characteristic)

SOSTANZE INTERFERENTI

La sensibilità del test Anti-MAG Antibodies ELISA a farmaci orali e iniettabili e a sostanze endogene è stata valutata secondo le linee guida EP07-A3 del CLSI. Nei risultati, un bias eccedente il 20% è stato considerato un'interferenza.

Non sono state rilevate interferenze con le seguenti sostanze fino alle concentrazioni indicate: immunoglobulina endovenosa (20 mg/mL), cladribina (273 ng/mL), interferone alfa-2a (49,5 ng/mL), ibuprofene (0,22 mg/mL), fattore reumatoide (680 UI/mL), emoglobina (10 mg/mL), emolizzato (10 mg/mL), trigliceridi (20 mg/mL), bilirubina coniugata (0,4 mg/mL), bilirubina non coniugata (0,4 mg/mL).

TABELLE E FIGURE

Esempio di risultati

	Livello [BTU]	Assorbanza [OD]	Livello calc. [BTU]	CV [%]
Bianco 1		0,046		
Bianco 2		0,049		
Media		**0,048**		
Calibratore A	70000	2,195	70497	
Calibratore A	70000	2,188	69508	
Media	**70000**	**2,191**	**70000**	**0,2**
Calibratore B	15000	1,272	15313	
Calibratore B	15000	1,245	14693	
Media	**15000**	**1,258**	**15000**	**1,5**
Calibratore C	3000	0,417	3070	
Calibratore C	3000	0,400	2931	
Media	**3000**	**0,408**	**3000**	**2,9**
Calibratore D	1000	0,135	1009	
Calibratore D	1000	0,132	991	
Media	**1000**	**0,134**	**1000**	**1,5**
Controllo BASSO		0,360	2602	
Controllo BASSO		0,376	2731	
Media		**0,368**	**2666**	**3,1**
Controllo ALTO		1,395	18433	
Controllo ALTO		1,383	18090	
Media		**1,389**	**18261**	**0,6**
Campione 1		0,001	255	
Campione 1		0,009	297	
Media		**0,005**	**276**	**116,5**
Campione 2		1,092	11599	
Campione 2		0,969	9511	
Media		**1,030**	**10555**	**8,5**

Tabella 6

Esempio di curva standard (OD_{450})

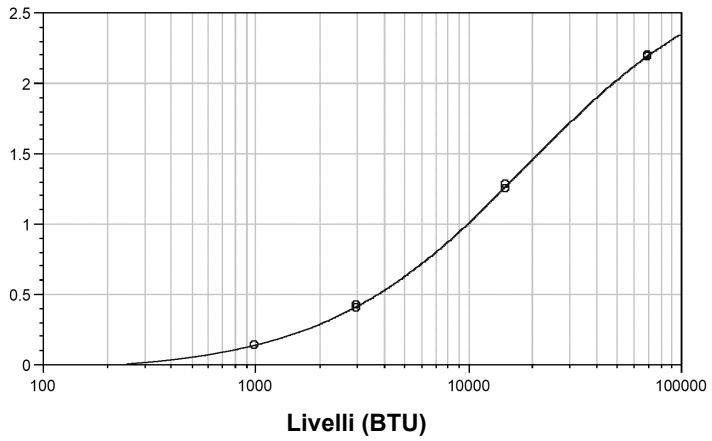


Figura 1

Precisione intra-laboratorio

ID	Livello medio, BTU	n	Intra-analisi		Tra analisi		Tra giorni		Intra-laboratorio	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
S2	2251	80	267	11,8	199	8,8	130	5,8	357	15,9
S3	8849	80	349	3,9	314	3,6	122	1,4	485	5,5
S4	19683	80	622	3,2	1492	7,6	908	4,6	1855	9,4
S5	37185	80	1684	4,5	3083	8,3	1466	3,9	3806	10,2

Tabella 7

ID	Descrizione	n	Livello medio, BTU	% rientranti nella categoria
S1	< 1000 BTU (negativo)	80	213	98,8

Tabella 8

Riproducibilità

ID	Livello medio, BTU	n	Intra-analisi		Tra analisi		Tra giorni		Intra-laboratorio	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
S2	2802	75	181	6,5	517	18,4	261	9,3	606	21,6
S3	9052	75	258	2,9	821	9,1	279	3,1	904	10,0
S4	18241	75	531	2,9	1146	6,3	1475	8,1	1942	10,6
S5	34713	75	893	2,6	2740	7,9	2023	5,8	3521	10,1

Tabella 9

ID	Descrizione	n	Livello medio, BTU	% rientranti nella categoria
S1	< 1000 BTU (negativo)	75	55	100,0

Tabella 10

Reattività incrociata/Altre eziologie

Anticorpo assegnato	Diagnosi	#
Anticorpo anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA)	Vasculite	3
	Altri (campioni indicati come ANCA positivi)	10
Anticorpi anti-nucleo (ANA)	Lupus eritematoso sistemico	5
	Artrite reumatoide	9
	Sindrome di Sjogren	6
	Altri (campioni indicati come ANA positivi)	3
Anticorpi anti-tireoglobulina (anti-Tg)	Tiroidite autoimmune	5
Anticorpi anti-ribonucleoproteine	Malattie miste del tessuto connettivo	1
Anti-GQ1b, anti-GM1, anti-GD1b	Neuropatie periferiche autoimmuni	1
Anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina e anti-tirosinchinasi muscolo-specifica	Miastenia gravis	7

Tabella 11

Eziologia	Diagnosi	#
Neuropatie periferiche	Alcolismo	1
	Diabete	5
Altre malattie neurologiche e rilevanza diagnostica differenziale	Sclerosi laterale amiotrofica	15
	Malattia di Chagas	5
	Sarcoidosi	4
	Malattia di Waldenstrom	4

Tabella 12

TABELLE E FIGURE

Prestazioni cliniche

Studio	Controlli positivi	Controlli negativi	Cut-off	Sens.	Spec.
Kuijf et al., 2009	DPN +IgM MG (n = 68)	OPN + HC (n = 139)	1500 BTU	0,72	0,97
Mata et al., 2011	MGUS PN (n = 46)		3200 BTU	0,37	
Campagnolo et al., 2015	DPN +IgM MG (n = 20)	HDC + HC (n = 3)	1000 BTU	0,94	1,00
Stork et al., 2014	DPN +IgM MG (n = 26)		1000 BTU	0,69	
Stork et al., 2016	DPN +IgM MG (n = 83)	HC (n = 83)	1000 BTU	0,59	1,00
Taams et al., 2018	MGUS PN (n = 101)		1500 BTU	0,51	
Liberatore et al., 2020		OPN + HC (n = 222)	7000 BTU		1,00

Tabella 13

DPN+IgM MG, polineuropatia demielinizzante con gammopatia monoclonale IgM; MGUS PN, polineuropatia associata a gammopatia monoclonale di significato non noto; OPN, altra polineuropatia; HC, controllo sano; HDC, controlli con malattie ematologiche

anti-MAG Antibodies ELISA

Piastra per microtitolazione pre-rivestita

↓ *lavare 4x con ≥300 µL di tampone di lavaggio*

100 µL di tampone di incubazione, calibratori, controlli o campione di siero (1:1000)

↓ *incubare 2 ore (± 5 min) a 2-8 °C*

lavare 4x con ≥300 µL di tampone di lavaggio

aggiungere 100 µL di marcatore enzimatico

↓ *incubare 2 ore (± 5 min) a 2-8 °C*

lavare 4x con ≥300 µL di tampone di lavaggio

aggiungere 100 µL di substrato TMB

↓ *incubare 30 minuti (± 2 min) a 18-28 °C*
su un agitatore per piastre a ~400-600 rpm

aggiungere 100 µL di soluzione di stop

→ **Leggere l'assorbanza a 450 nm (entro 30 minuti)**

TEMPO PER OTTENERE UN RISULTATO: 4,5 ore

RIFERIMENTI

1. Blirup-Jensen, S., Johnson, A. M. & Larsen, M. Protein standardization V: Value transfer. A practical protocol for the assignment of serum protein values from a Reference Material to a Target Material. *Clin. Chem. Lab. Med.* **46,** 1470–1479 (2008).

2. CLSI guidelines EP30-A - Characterization and Qualification of Commutable Reference Materials for Laboratory Medicine (2010).

3. Kuijf, M. L. et al. Detection of anti-MAG antibodies in polyneuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. Neurology 73, 688–695 (2009).

4. Matà, S. et al. IgM monoclonal gammopathy-associated neuropathies with different IgM specificity. Eur. J. Neurol. 18, 1067–1073 (2011).

5. Stork, A. C. J. et al. Classical and lectin complement pathway activity in polyneuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. J. Neuroimmunol. 290, 76–79 (2016).

6. Stork, A. C. J. et al. Fcγ receptor IIIA genotype is associated with rituximab response in antimyelin-associated glycoprotein neuropathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 85, 916–918 (2014).

7. Liberatore, G. et al. Sensitivity and specificity of a commercial ELISA test for anti-MAG antibodies in patients with neuropathy. J. Neuroimmunol. 345, (2020).

8. Taams, N. E. et al. Clinical relevance of serum antibodies to GD1b in immune-mediated neuropathies. J. Peripher. Nerv. Syst. 23, 227–234 (2018).

9. Campagnolo, M. et al. Polyneuropathy with anti-sulfatide and anti-MAG antibodies: Clinical, neurophysiological, pathological features and response to treatment. J. Neuroimmunol. 281, 1–4 (2015).

10. Vallat, J-M. et al. The Wide Spectrum of Pathophysiologic Mechanisms of Paraproteinemic Neuropathy. Neurology 96, 214-225 (2021).

REGISTRO DELLE MODIFICHE

Data	Versione	Modifica
2023-05-31	A2	Modifica dell'*Uso previsto* e del nome del prodotto Riformulazione del *Principio del dosaggio* Nuove stabilità dei reagenti durante l'uso Aggiornamento del capitolo *Avvertenze e precauzioni* Revisione dei capitoli *Raccolta e conservazione dei campioni, Procedura del test, Standardizzazione e tracciabilità metrologica* Riformulazione dei capitoli *Controllo di qualità* e *Calcolo dei risultati del test* Aggiornamento del capitolo *Limitazioni* Introduzione dei capitoli *Interpretazione dei risultati* e *Prestazioni cliniche* Revisione dei capitoli *Intervalli di riferimento e cut-off, Caratteristiche prestazionali, Sostanze interferenti, Riferimenti* e *Simboli* Aggiunta del numero di ente notificato al marchio CE – procedura di valutazione della conformità conformemente al Regolamento sui dispositivi diagnostici in vitro (IVDR) 2017/746

SEGNALAZIONE DI INCIDENTI NEGLI STATI MEMBRI UE

Si prega di segnalare immediatamente al produttore e alle autorità competenti del proprio paese eventuali incidenti gravi avvenuti in relazione all'uso di questo dispositivo.

DANNI DOVUTI ALLA SPEDIZIONE

Informare il proprio distributore se il prodotto è stato ricevuto danneggiato.

SIMBOLI

BÜHLMANN utilizza i simboli e i segni elencati e descritti in ISO 15223-1. Inoltre, vengono utilizzati i seguenti simboli e segni:

Simbolo	Spiegazione
MP	Micropiastra
BUF INC	Tampone di incubazione
BUF WASH 10X	Tampone di lavaggio concentrato (10x)
CONTROL L	Controllo Basso
CONTROL H	Controllo Alto
CAL A - CAL D	Calibratore A - D
EL IgM	Marcatore enzimatico IgM
SUBS TMB	Substrato di TMB
SOLN STOP	Soluzione di stop

CE 0123