



anti-MAG Autoantibodies ELISA

MAG = Myelin Associated Glycoprotein

EK-MAG 96 tests

Release Date: 2018-10-26
Version A1

ENGLISH

INTENDED USE

The anti-MAG Autoantibodies ELISA is intended for the quantitative *in vitro* diagnostic determination of human IgM-auto-antibodies directed against Myelin Associated Glycoprotein (MAG) in serum. It serves as an aid to diagnosis of Paraproteinemic Demyelinating Neuropathy (PDN) in conjunction with other clinical and laboratory findings (1-7).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The anti-MAG Autoantibodies ELISA employs the quantitative enzymatically amplified sandwich-type immunoassay technique. The microtiter plates of the test are precoated with highly purified MAG from human brain (1). Calibrator, controls, and patient sera are incubated in the microtiter wells and any anti-MAG auto-antibodies present in the samples bind to the immobilized human MAG. After washing off of unbound substances, the anti-MAG auto-antibodies are detected with horseradish-peroxidase (HRP) labelled antibodies against human IgM. Following a second washing step, in which unbound enzyme label is removed, a substrate solution containing tetramethyl-benzidine (TMB) is added. A blue color develops in proportion to the amount of antibodies bound to the immobilized human MAG. Color development is stopped by adding an acidic stop solution (diluted sulphuric acid) which turns the blue solution into yellow. The intensity of the color is measured at 450 nm.

The measured absorbance is proportional to the titre of anti-human MAG auto-antibodies present in a given sample. A set of human anti-MAG auto-antibody calibrators is used to plot a calibration curve of absorbance versus human anti-MAG auto-antibody titer units. The concentrations of anti-human MAG auto-antibodies in the samples is calculated based on the calibration curve.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

| Reagents | Quantity | Code | Reconstitution |
|---|---------------------------------|--------------|---------------------------------------|
| Microtiter Plate 96 wells precoated with human MAG | 12 x 8-wells strips with holder | B-MAG-MP | Ready to use |
| Plate Sealer | 3 pieces | | |
| Wash Buffer Concentrate (10x) | 1 bottle 100 mL | B-MAG-WB | Dilute with 900 mL of deionized water |
| Incubation Buffer with preservatives | 1 bottle 100 mL | B-MAG-IB | Ready to use |
| Calibrators A to D¹ Human serum with preservatives | 4 vials | B-MAG-CASET | Add 1 mL of Incubation Buffer |
| Low and High Control² Human serum with preservatives | 2 vials | B-MAG-CONSET | Add 1 mL of Incubation Buffer |
| Enzyme Label IgM Anti-human IgM antibody conjugated to HRP in a protein-based buffer with preservatives | 1 vial 11 mL | B-MAG-ELM | Ready to use Blue solution |

| Reagents | Quantity | Code | Reconstitution |
|---|-----------------|--------|--|
| TMB Substrate TMB in Citrate buffer | 1 vial 11 mL | B-TMB | Ready to use |
| Stop Solution 0.25 M Sulfuric acid | 1 vial 11 mL | B-STTS | Ready to use Corrosive agent |

Table 1

¹ After reconstitution, calibrators A, B, C and D contain 70000, 15000, 3000 and 1000 BÜHLMANN Titer Units (BTU) of anti-MAG antibodies, respectively.

² Controls contain lot-specific amounts of anti-MAG antibodies. Refer to the additional QC data sheet for exact concentrations.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

| Sealed / Unopened Reagents | |
|--|---|
| All sealed/unopened kit components are stable at 2-8 °C until the expiration date printed on the labels. | |
| Opened / Reconstituted Reagents | |
| Microtiter Plate | Return unused strips immediately to the foil pouch containing the desiccant packs and reseal along the entire edge of zip-seal. Store for up to 2 months at 2-8 °C. |
| Diluted Wash Buffer | Store for up to 2 months at 2-8 °C. |
| Calibrators | Store for up to 2 months at -20 °C. |
| Controls | |
| Incubation Buffer | Store at 2-8 °C until expiration date printed on the labels. |
| Enzyme Label IgM | |
| TMB Substrate | |
| Stop Solution | Store at 18-28 °C until expiration date printed on the labels. |

Table 2

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes with disposable tips: 20 µL, 100 µL and 1000 µL pipettes.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 mL cylinder for the dilution of the wash buffer.
- Squeeze bottle for wash buffer or automatic microtiter plate washer.
- Blotting paper.
- Orbital shaker for microtiter plates.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.

PRECAUTIONS

Safety precautions

- The microtiter-plate (B-MAG-MP), calibrators (B-MAG-CASET) and controls (B-MAG-CONSET) of this kit contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions.
- **Stop solution:** The stop solution (B-STTS) contains sulfuric acid (0.25 M). The reagent is an irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothes. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.

- **Reagents:** Avoid contact of reagents with the skin, eyes, or mucous membranes. If contact does occur, immediately wash with generous amounts of water; otherwise, irritation / burns can occur.
- Unused solution should be disposed of according to local state and federal regulations.

Technical precautions

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- **Residues in the microtiter plate wells** result from the production process. They are removed in the washing step (assay procedure step 3) and do not affect the results.
- **Prepare reagents before starting the assay procedure.** Reagents used in **steps 3-9** must be cold (2-8 °C) and kept cold while pipetting and washing. Put the TMB substrate at room temperature (18-28 °C).
- **Steps 3-9:** Use cold (2-8 °C) reagents for all these steps and keep them cold while pipetting. Recommendation: Prepare the wash buffer the evening before performing the assay and place it into the fridge overnight.
- **Wash steps 3, 6 and 9:** The wash steps are crucial for removing residues in the microtiter plate wells resulting from the production process (step 3) as well as any unbound antibodies (steps 6 and 9).
 - Always perform the wash steps with cold (2-8 °C) wash buffer.
 - Make sure that all wells are completely empty after the last washing cycle.
- **Step 10:** Adjust TMB substrate to room temperature (18-28 °C) before using it.
- **Step 11:** Shake the microtiter plates during the incubation with substrate. Depending on the plate shaker, we recommend 400-600 rpm. The solution should move in the wells but must not spill over.
- If an automated washer is used, “plate mode” should be chosen so that dispensing is performed sequentially on all strips before aspirating.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Every effort should be made to ensure that no cross contamination occurs between reagents, samples or between wells.
- Microwells cannot be re-used.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- The procedure requires <0.1 mL of blood or <50 µL of serum, respectively.
- Lipemic, hemolytic and icteric samples should not be used in this assay. Lipemic samples can be avoided by asking patients to fast for at least 12 hours prior to the sample being taken.
- Collect blood into plain tubes (no anti-coagulant), avoid hemolysis, leave to clot for one hour at room temperature

(18-28 °C), centrifuge for 10-30 minutes at 1000-2000 x g, collect the serum.

- Store serum samples at ≤-20 °C. Samples are stable for ≥1 year if stored at ≤-20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Frozen samples should be thawed and mixed thoroughly by gentle swirling or inversion prior to use.
- We recommend freezing aliquots of patient samples in order to avoid repeated freezing/thawing.

ASSAY PROCEDURE

1. Dilute all patient samples to be investigated 1:1000 with incubation buffer. Use 2 µL of serum + 2000 µL of incubation buffer. Mix thoroughly by vortexing and leave diluted samples for one hour at 18-28 °C. Put samples as well as reconstituted calibrators and controls for 10 minutes on ice prior to pipetting in step 4.
2. **Prepare a plate-frame** with the required number of strips to test the calibrators, controls and patient samples. Reseal the remaining strips in the foil pouch together with the desiccant packs **immediately**. Store refrigerated.

Note: Use cold reagents in steps 3 to 9.

3. Wash coated wells four times using at least 300 µL of cold! wash buffer per well. Empty wells and tap plate firmly onto blotting paper to remove remaining liquid completely.
- 4a. Pipet 100 µL of incubation buffer (blank) in duplicate into wells A1+A2.
 - Pipet 100 µL of calibrator A in duplicate into wells B1+B2.
 - Pipet 100 µL of calibrator B in duplicate into wells C1+C2.
 - Pipet 100 µL of calibrator C in duplicate into wells D1+D2.
 - Pipet 100 µL of calibrator D in duplicate into wells E1+E2.
- 4b. Pipet 100 µL of the low control in duplicate into wells F1+F2.
 - Pipet 100 µL of the high control in duplicate into wells G1+G2.
- 4c. Pipet 100 µL of each diluted sample in duplicate into the subsequent wells.
5. Cover the plate with a plate sealer and incubate for 2 hours (±5 min) at 2-8 °C.
6. Remove plate sealer. Empty the wells and wash four times using at least 300 µL of cold wash buffer (2-8 °C) per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper in order to remove wash buffer completely.
7. Add 100 µL of enzyme label IgM to all wells.
8. Cover plate with a plate sealer and incubate for 2 hours (±5 min) at 2-8 °C.
9. Remove plate sealer. Empty the wells and wash four times using at least 300 µL of cold wash buffer (2-8 °C) per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.

Note: Adjust TMB substrate solution to room temperature (18-28 °C).

10. Add 100 µL of TMB substrate solution to each well.
11. Cover plate with a plate sealer, incubate plate on an orbital plate shaker at 400-600 rpm for 30 ± 2 minutes at 18-28 °C. Protect the plate from direct light.
12. Add 100 µL of **stop solution** to all wells. Proceed to step 13 within 30 minutes.

13. Read the absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.

QUALITY CONTROL

A good understanding of this instruction for use is necessary to obtain reliable results. These will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following the instruction for use.

Since there is no control serum for anti-MAG antibodies commercially available, we recommend using a positive, and negative serum pool for internal quality control.

All controls must be within established confidence ranges (BTU). The confidence ranges of the controls are lot-specific and printed on the QC data sheet delivered with this kit.

Performance characteristics should be within established limits. If these characteristics are not in conformity with established limits and repetition excludes handling failures, check the following issues: i) Have all reagents, used in step 3-10, been kept at 2-8 °C? ii) accuracy of pipets, thermometers, and timers, iii) settings of ELISA washer and reader, iv) expiration date of the reagents v) storage and incubation conditions vi) color of the TMB substrate solution (should be colorless) vii) purity of the water.

STANDARDIZATION

The calibrators included in this kit have been standardized against an internal reference pool. The reference pool consists of more than ten human sera containing low, medium and high titers of anti-MAG antibodies, respectively. Titers and specificity of each serum in the reference pool were first analyzed by anti-MAG immunoblots.

BÜHLMANN Titer Units (BTU) were established as follows:

- Normal donor samples were assayed according to the anti-MAG Autoantibodies ELISA assay procedure.
- Serially diluted samples of the reference pool were assayed in the same run.
- The dilution at which the reference pool sample falls short of the cut-off corresponds to the titer of the reference pool.

Note: Serum titer values depend on the assay method and, in particular, on the specificity and the cut-off values established with an individual assay method. Therefore, titer values obtained with different methods cannot be compared directly.

RESULTS AND CALCULATION

Calibration curve

Record the absorbance at 450 nm for each well to construct a calibration curve from the average of the calibrator duplicates, subtracting the average blank OD from each calibrator. It is recommended to use a software program to calculate the calibration curve and to determine the concentration of the samples, using a 4 parameter logistic (4 PL) fit.

Samples and controls

- Record the absorbance at 450 nm for each sample and control well. Subtract the average blank OD from the average of duplicate values for each sample and control.
- Locate the absorbance values of the samples and controls on the vertical axis, draw a horizontal line

intersecting the calibration curve and read from the horizontal axis.

If the microtiter plate reader is not capable of reading absorbance greater than 2 or greater than the absorbance of the highest calibrator (calibrator A), a second reading at a wavelength of 490 or 492 nm is recommended (reference filter at 600 or 620 nm if available). In this case, proceed to construct a second calibration curve with the absorbance readings of all calibrators at 490 or 492 nm. The concentration of the off-scale samples at 450 nm are then read from the new calibration curve as described above. The readings at 490 or 492 nm should not replace the on-scale readings at 450 nm.

Note: The results presented in table 3 and figure 1 are examples. Calibrator and controls must be used in each individual assay.

Results and calibration curve are provided for demonstration purposes only. A calibration curve must be generated for each set of samples to be assayed.

LIMITATIONS

1. Test results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.
2. The anti-MAG Autoantibodies ELISA has not been validated for plasmapheresis samples.

REFERENCE INTERVALS AND CUT-OFF

The frequency of anti-MAG auto-antibodies in normal human sera was determined using blood samples from asymptomatic volunteer blood donors (adult men and women at the age of 18 to 70 years). 150 samples were assayed according to the assay procedure and the results listed in table 4 were obtained.

Note: These titer ranges should be used as guidelines only. It is recommended that each laboratory establishes its own expected ranges for its patient population.

Proposed cut-off Titer

The mean +3 SD results in a technical cut-off value of 729 BTU. For practical reasons, we recommend to use a cut-off value of 1000 BTU, corresponding to the lowest calibrator (=calibrator D) in the standard curve.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision (Within-Run): 6.5 %. The intra-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values obtained in a single run (table 5).

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 15.4 %. The inter-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values obtained in 20 different runs (table 6).

Limit of Blank (LoB): 444 BTU. 20 duplicates of incubation buffer were assayed in a single run. Mean and standard deviation were calculated for the absorbance values. The minimal detectable dose of anti-MAG antibodies was calculated to be 444 BTU by adding two standard deviations to the mean absorbance and intersecting this value with the standard curve obtained in this run.

Limit of Quantification (LoQ): 900 BTU. 20 duplicates of low titer anti-MAG auto-antibodies were assayed in a single

run. Mean, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were calculated from the absorbance values. We found a titer of 900 BTU with a CV less than 10 %.

Dilution Linearity/Parallelism: 147 %. Seven human serum samples containing high titer of anti-MAG antibodies were diluted with incubation buffer 1:1000 to 1:64000, left for one hour at 18-28 °C and subsequently assayed according to the assay procedure (table 7). It is suggested that the relatively high deviation in about 50 % of the samples is due to antibody aggregations. In general, pathological sera show strongly elevated titer of auto-antibodies therefore it has no influence to the positive/negative discrimination.

Specificity: Four sets of experiments were performed to assess the specificity of the anti-MAG Autoantibodies ELISA:

1. Neutralization of anti-MAG auto-antibodies: Five sera with high anti-MAG titers could be inhibited from binding to the microtiter plates coated with MAG in a concentration-dependent manner when preincubated for 1 hour with incubation buffer supplemented with 1 to 200 µg/mL of MAG prior to testing in the ELISA.

2. Specificity of anti-MAG auto-antibody binding: Five sera with medium to high anti-MAG auto-antibody titers and five negative sera were tested on GanglioCombi (EK-GCO) plate coated with GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b. None of the sample showed ratio higher than 10 %. Similarly, six sera with high anti-Ganglioside auto-antibody titers (see above) and five negative sera, were tested on plates coated with MAG. None of these disease state sera gave a signal higher than 300 BTU.

3. Comparison to immunoblot (Western Blot): 127 patients sera (40 female; 87 male; age 4-90 years) with neurological diseases suspectedly caused by anti-MAG auto-antibodies were tested by the ELISA and a western blot method, respectively. MAG isolated from human central nervous system (CNS) was used in both methods. All twelve sera showing medium to very high titers of anti-MAG IgM auto-antibodies in the ELISA procedure were also clearly positive when analyzed on immunoblots. 114 out of 115 sera showing anti-MAG IgM antibody titers below the ELISA cut-off value were also negative when analyzed on immunoblots, whereas one serum was slightly positive by the immunoblot method only (F. Ferracin and A.J. Steck, unpublished results).

4. Comparison to indirect immunofluorescence assay (IFA): Sera from 150 patients (unknown sex and age) diagnosed as having IgM monoclonal gammopathies were tested by the ELISA and an IFA method, respectively. In the IFA method, sera were incubated on frozen and acetone-fixed monkey sciatic nerve sections and bound anti-MAG antibodies were detected by FITC-labeled anti-human IgM antibody. 26 patients (17.3 %) were positive and 115 patients (76.7 %) were negative in both methods, whereas five sera (3.3 %) were positive in the IFA method only and four sera (2.7 %) were only positive in the ELISA method, respectively (2).

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der anti-MAG Autoantikörper ELISA Test wird gebraucht für die direkte und quantitative in vitro diagnostische Bestimmung von IgM-Autoantikörpern gegen das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) im Serum. Er unterstützt in Verbindung mit anderen klinischen Ergebnissen und Laborergebnissen die Diagnose einer paraproteinämischen, demyelisierenden Neuropathie (PDN) (1-7).

PRINZIP DER METHODE

Der vorliegende anti-MAG Autoantikörper ELISA Test ist ein immunometrischer Festphasen-Enzymimmunoassay. Die Mikrotiterplatten des Tests sind mit hochreinem MAG aus dem menschlichen Gehirn vorbeschichtet (1). Kalibrator, Kontrollen und Patientenseren werden in den Wells der Mikrotiterplatte inkubiert und alle in der Probe vorliegenden anti-MAG Autoantikörper binden an immobilisiertes humanes MAG. Nach dem Abwaschen der nichtgebundenen Substanzen, werden die anti-MAG Autoantikörper mit HRP-konjugierten Antikörpern nachgewiesen, die gegen humanes IgM gerichtet sind. Danach werden die ungebundenen Enzymkonjugat-Antikörper durch Waschen entfernt. Die Substratlösung, die Tetramethylbenzidin (TMB) enthält, wird hinzugefügt. Eine blaue Farbe entwickelt sich proportional zur Menge der Antikörper, die an immobilisiertes humanes MAG gebunden sind. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer sauren Stopplösung beendet (verdünnte Schwefelsäure) und bewirkt einen Farbumschlag (gelb). Die Intensität der Farbe wird bei 450 nm gemessen.

Die gemessene Absorption ist proportional zum Titer der anti-human-MAG Autoantikörper, die in der jeweiligen Probe vorhanden sind. Zur Erstellung einer Kalibrierungskurve wird die Absorption einer Reihe von humanen-anti-MAG Autoantikörper Kalibratoren gegen anti-MAG Autoantikörper Titer-Einheiten aufgetragen. Die Konzentrationen der anti-MAG Autoantikörper in den Proben wird auf Basis der Kalibrierungskurve berechnet.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

| Reagenz | Inhalt | Art-Nr. | Rekonstitution |
|---|---------------------------------|--------------|---|
| Mikrotiterplatte Beschichtet mit humanem MAG | 8 x 12 Mikroküvetten mit Halter | B-MAG-MP | Gebrauchsfertig |
| Abdeckfolien | 3 Stück | | |
| Wasch-Puffer Konzentrat (10x) | 1 Flasche 100 mL | B-MAG-WB | Mit 900 mL deionisiertem H ₂ O verdünnen |
| Inkubations-Puffer Konservierungsstoffe | 1 Flasche 100 mL | B-MAG-IB | Gebrauchsfertig |
| Kalibrator A-D¹ Humanserum; Konservierungsstoffe | 4 Flaschen | B-MAG-CASET | Mit 1 mL Inkubations-Puffer versetzen |
| Kontrolle tief und hoch² Humanserum; Konservierungsstoffe | 2 Flaschen | B-MAG-CONSET | Mit 1 mL Inkubations-Puffer versetzen |

| Reagenz | Inhalt | Art-Nr. | Rekonstitution |
|--|--------------------|-----------|------------------------------------|
| Enzymmarker IgM Anti-human-IgM Antikörper, an HRP konjugiert, in einem Puffer auf Proteinbasis mit Konservierungsmitteln | 1 Flasche 11 mL | B-MAG-ELM | Gebrauchsfertig Blaue Lösung |
| TMB-Substrat TMB in Citratpuffer | 1 Flasche 11 mL | B-TMB | Gebrauchsfertig |
| Stopp-Lösung 0,25 M H ₂ SO ₄ | 1 vial 11 mL | B-ST5 | Gebrauchsfertig Korrosiv |

Tabelle 1

- Nach der Rekonstitution enthalten die Kalibratoren A, B, C und D 70000, 15000, 3000 und 1000 BÜHLMANN Titer Unit (BTU) anti-MAG Antikörper
- Kontrollen enthalten lot-spezifische anti-MAG Antikörper Mengen. Für Konzentrationsangaben siehe beigelegtes Kontrolldatenblatt.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

| Verschlossene/ Ungeöffnete Reagenzien | |
|--|--|
| Alle verschlossenen/nicht geöffneten Kitkomponenten sind bei 2-8 °C bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum stabil. | |
| Geöffnete/ Rekonstituierte Reagenzien | |
| Mikrotiterplatte | Ungebrauchte Streifen sofort in die mit Dessikator versetzte Packung zurückbringen. Packung völlig schliessen. Bis zu 2 Monate bei 2-8 °C haltbar. |
| Wasch-Puffer (verdünnt) | Zu verwenden bis 2 Monate nach Rekonstitution. Bei 2-8 °C lagern. |
| Kalibratoren | Zu verwenden bis 2 Monate nach Rekonstitution. |
| Kontrollen | Bei -20 °C lagern. |
| Inkubations-Puffer | Bis zum auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum bei 2-8 °C lagern. |
| Enzymmarker IgM | |
| TMB Substrat | |
| Stopp-Lösung | Bis zum auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum bei 18-28 °C lagern. |

Tabelle 2

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen für 20 µL, 100 µL und 1000 µL.
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Vorbereitung der Verdünnungsproben.
- 1000 mL Zylinder zur Verdünnung des Waschpuffers.
- Spritzflasche für Waschpuffer oder automatischer Mikrotiterplattenwascher.
- Saugfähiges Papier.
- Orbitalschüttler für Mikrotiterplatten.
- Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter (450 nm).

VORSICHTSMASSAHMEN

Sicherheitsmassnahmen

- Die Mikrotiterplatte (B-MAG-MP), Kalibratoren (B-MAG-CASET) und Kontrollen (B-MAG-CONSET) enthalten Komponenten menschlicher Herkunft. Obwohl sie negativ auf HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper getestet wurden, sollten sie gemäss Good Laboratory Practice als potentiell infektiös behandelt

werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.

- **Stopp-Lösung:** Die Stopp-Lösung (B-BTS) enthält Schwefelsäure (0,25 M). Das Reagenz reizt die Augen, Haut und Schleimhäute. Berührung mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Nach Berührung mit den Augen oder der Haut, sofort mit reichlich Wasser waschen.
- **Reagenzien:** Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder Schleimhäuten vermeiden. Bei Berührung, sofort mit reichlich Wasser waschen; ansonsten kann eine Reizung / Verätzung auftreten.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss der gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Technische Vorsichtsmassnahmen

- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negative beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Aufgrund des Produktionsprozesses können Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten sein. Sie werden mit dem 1. Waschen (Schritt 3) entfernt und haben keinen Einfluss auf die Ergebnisse.
- Vor dem Start der Analyse Reagenzien vorbereiten. Die in den Schritten 3-9 verwendeten Reagenzien müssen kalt sein (2-8 °C) und beim Pipettieren und Waschen kalt gehalten werden. Das TMB-Substrat muss bei Raumtemperatur (18-28 °C) gehalten werden.
- Schritte 3-9: Für all diese Schritte kalte (2-8 °C) Reagenzien verwenden und diese während des Pipettierens kalt halten. Empfehlung: Waschpuffer am Abend vor der Analyse vorbereiten und über Nacht in den Kühlschrank.
- Waschschritte 3, 6 und 9: Die Waschschritte sind sehr wichtig, um Rückstände, die vom Produktionsprozess herrühren (Schritt 3), sowie alle nichtgebundenen Antikörper (Schritte 6 und 9), von der Mikrotiterplatte zu entfernen.
→Die Waschschritte immer mit kaltem (2-8 °C) Waschpuffer durchführen.
→Die Wells müssen nach dem letzten Waschzyklus vollständig entleert werden.
- Schritt 10: Das verwendete TMB Substrat muss auf Raumtemperatur (18-28 °C) gebracht werden.
- Schritt 11: Während der Substratinkubation muss die Platte geschüttelt werden. Die angegebenen rpm (400-600) können nicht direkt auf jeden Schüttler übertragen werden. Die Lösung in den Wells soll in Bewegung gebracht werden, darf aber nicht überschwappen.
- Wird ein Waschautomat eingesetzt, soll der sogenannte „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass das Einfüllen des Waschpuffers erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor das Absaugen gestartet wird.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kit Lots.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu einer Kontamination zwischen verschiedenen Reagenzien,

Proben und zwischen den Wells der Mikrotiterplatte kommt.

- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

- Dieser Test benötigt <0,1 mL Blut oder <20 µL Serum.
- Lipämische, hämolytische oder ikterische Blutproben sollten nicht verwendet werden. Lipämische Proben können verhindert werden, indem der Patient mindestens 12 Stunden vor der Blutentnahme keine Nahrung zu sich nimmt.
- Die Blutproben in den entsprechenden Röhrchen sammeln (kein Antikoagulans), Hämolyse vermeiden, eine Stunde lang bei Raumtemperatur (18-28 °C) gerinnen lassen, 10-30 Minuten lang bei Raumtemperatur und 1000-2000 x g zentrifugieren, danach Serum sammeln.
- Serumproben bei ≤-20 °C lagern. Die Proben sind ≥1 Jahr haltbar, wenn sie bei ≤-20 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Gefrorene Proben vor dem Gebrauch auftauen und durch leichtes Rühren gut mischen.
- Wir empfehlen das Einfrieren von Aliquoten der Patientenproben, um ein wiederholtes Einfrieren/ Auftauen zu vermeiden.

ARBEITSANLEITUNG

1. Alle zu untersuchenden Patientenproben mit Inkubationspuffer im Verhältnis 1:1000 verdünnen. 2 µL Serum + 2000 µL Inkubationspuffer verwenden. Vor dem Pipettieren in Schritt 4 durch Vortexen gründlich mischen und die verdünnten Proben eine Stunde bei 18-28°C stehen lassen. Proben und rekonstituierte Kalibratoren und Kontrollen für 10 Minuten auf Eis stellen.
2. Einen Mikrotiterplatterahmen mit ausreichend Streifen für den Ansatz bestücken, um die Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben zu testen. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und sofort mit dem Trockenmittel verpacken. Gekühlt lagern.

Hinweis: Verwenden Sie in den Schritten 3 bis 9 kalte Reagenzien.

3. Beschichtete Wells der Mikrotiterplatte vier Mal mit mindestens 300 µL kaltem! Waschpuffer pro Well waschen. Wells und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen, um die Flüssigkeit vollständig zu entfernen.
- 4a. Jeweils 100 µL Inkubations-Puffer in die Wells A1 und A2 pipettieren (Blank).
Jeweils 100 µL Kalibrator A in die Wells B1 und B2 pipettieren.
Jeweils 100 µL Kalibrator B in die Wells C1 und C2 pipettieren.
Jeweils 100 µL Kalibrator C in die Wells D1 und D2 pipettieren.
Jeweils 100 µL Kalibrator D in die Wells E1 und E2 pipettieren.
- 4b. Jeweils 100 µL Kontrolle tief in die Wells F1 und F2 pipettieren.

Jeweils 100 µL Kontrolle hoch in die Wells G1 und G2 pipettieren.

- 4c. Jeweils 100 µL von jeder verdünnten Serumprobe in die nächsten zwei Wells pipettieren.
5. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden (± 5 Minuten) bei 2-8 °C inkubieren.
6. Abdeckfolie entfernen. Die Wells der Mikrotiterplatte entleeren und vier Mal mit jeweils mindestens 300 µL kaltem Waschpuffer pro Well waschen. Wells durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen.
7. 100 µL Enzymmarker IgM zu jedem Well zugeben.
8. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden (± 5 Minuten) bei 2-8 °C inkubieren.
9. Abdeckfolie entfernen und die Wells der Mikrotiterplatte entleeren und viermal mit jeweils ≥ 300 µL kaltem Waschpuffer (2-8 °C) waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

Hinweis: TMB-Substratlösung auf Raumtemperatur äquilibrieren (18-28 °C).

10. 100 µL TMB-Substrat zu jedem Well zugeben.
11. Mikrotiterplatte mit Abdeckfolie abdecken und 30 \pm 2 Minuten bei 18-28 °C auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 400-600 U/min inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.
12. 100 µL Stopp-Lösung zu jedem Well hinzugeben. Innerhalb von 30 Minuten mit Schritt 13 fortfahren.
13. Absorption bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer messen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Für zuverlässige Ergebnisse ist ein gutes Verständnis dieser Gebrauchsanweisung notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die genaue Einhaltung der Arbeitsanleitung erreicht.

Da es keine kommerziell erhältlichen Kontrollen für Anti-MAG-Antikörper gibt, wird empfohlen, positive und negative Serumproben als interne Qualitätskontrolle anzuwenden.

Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen (BTU). Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind lot-spezifisch und auf dem zusätzlichen Kontrollblatt angegeben. Die Leistungsmerkmale müssen innerhalb der etablierten Grenzwerte liegen. Falls die Leistungsmerkmale des Tests nicht in den angegebenen Bereichen liegen und Wiederholungsmessungen ein technisches Problem ausschließen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Wurden alle Reagenzien in Schritt 3-10 bei 2-8 °C verarbeitet? ii) Pipetten, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, iii) Photometer Eichung, iv) Verfallsdaten der Reagenzien, v) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, vi) die TMB Substratlösung sollte farblos sein, vii) Wasserreinheit.

STANDARDISIERUNG

Die Kalibratoren wurden gegen ein internes Referenzpool (>zehn individuelle Humansenen mit niedrigem, mittlerem und hohem Anti-MAG Autoantikörper-Titer) standardisiert. Die Spezifität und der Autoantikörpergehalt dieser Proben,

wurde zuvor mittels eines Anti-MAG Immunoblots charakterisiert.

Die Definition der BÜHLMANN Titer Units (BTU) lautet wie folgt:

- Der Antikörpergehalt in Proben normaler Blutspender wurde im anti-MAG Autoantikörper ELISA Test entsprechend der Arbeitsanleitung bestimmt.
- Lineare Verdünnungsreihen der Proben des internen Referenzpools wurden in demselben Testansatz mitbestimmt.
- Die Verdünnung, bei der die jeweilige Referenzprobe unter den zuvor auf der Basis der Normalproben errechneten Cut-Off fällt, entspricht dann dem Titer der Referenzprobe in BÜHLMANN Titer Units.

HINWEIS: Die für die Anti-MAG ermittelten Serumtiter sind abhängig von der verwendeten Methode und daher nicht direkt untereinander vergleichbar. Für longitudinale Studien können nur solche Ergebnisse miteinander verglichen werden, die mit derselben Methode ermittelt wurden.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Eichkurve

Optische Dichte aller Wells der Mikrotiterplatte bei 450 nm aufzeichnen, um aus dem Mittelwert der Kalibrator Doppelmessung eine Kalibrierungskurve zu erstellen. Hierbei wird der mittlere Blank-OD von jedem Kalibratorwert subtrahiert. Zum Berechnen der Kalibrierungskurve und Bestimmen der Konzentration der Proben wird die Nutzung eines Softwareprogramms empfohlen, das eine 4-Parameter-Logistik (4 PL) verwendet.

Proben und Kontrollen

- Absorption bei 450 nm für jede Probe und Kontrolle messen. Der mittlere Blank-OD wird vom OD-Mittelwert jeder Probe und Kontrolle subtrahiert.
- Konzentration der unbekanntenen Proben durch Interpolation aus der Eichkurve bestimmen.

Falls das Mikrotiterplatten-Photometer nicht fähig ist, Absorptionen grösser als 2 oder als die Absorption des höchsten Kalibrators zu messen, sollte eine zweite Messung bei 490 oder 492 nm (mit 600 oder 620 nm-Referenzfilter, falls vorhanden) durchgeführt werden. In diesem Fall sollte eine zweite Eichkurve aus den Absorptionsmessungen aller Kalibratoren bei 490 oder 492 nm gebildet werden. Die Konzentration, der ausserhalb des Anzeigebereiches liegenden Proben, kann dann mit der neuen Eichkurve bestimmt werden. Die Messungen bei 490 oder 492 nm dürfen in keinem Fall die „on-scale“ Messungen bei 450 nm ersetzen.

Hinweis: Die Ergebnisse in den Tabellen 3 und Abbildung 1 sind Beispiele. Kalibrator und Kontrollen müssen in jedem individuellen Assay verwendet werden.

Die Ergebnisse und die Kalibrierungskurve sind nur zur Veranschaulichung angegeben. Für jeden zu analysierenden Probensatz muss eine Kalibrierungskurve erstellt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN DER LEISTUNGSMERKMALE

1. Die Ergebnisse sollten in Verbindung mit der Anamnese des Patienten und weiteren diagnostischen Tests verwendet werden.

2. Der anti-MAG Antikörper ELISA wurde nicht für Plasma- phereseproben getestet.

REFENZINTERVALLE UND CUT-OFF RATIO

Die Frequenz der Anti-MAG Autoantikörper in normalem Humanserum wurde mit Blutproben von asymptomatischen Blutspendern (männliche und weibliche Erwachsene von 18 zu 70 Jahre alt) ermittelt. 150 Serumproben wurden entsprechend der Arbeitsanleitung untersucht und die in Tabelle 4 angegebenen Ergebnisse wurden erhalten.

HINWEIS: Die angegebenen Werte dienen nur als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor eigene zu erwartende Normalbereiche ermittelt, welche auf ihre Patientenpopulation zutreffen.

Vorgeschlagener Grenzwert (Cut-Off)

Der Mittelwert +3 Standardabweichung [SD] ergibt einen technischen Cut-Off von 729 BTU. Aus praktischen Gründen wird ein Grenzwert von 1000 BTU als positive Cut-Off-Konzentration empfohlen, der zum untersten Standard der Eichkurve (Kalibrator D) korrespondiert.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision (Within-Run): 6,5 %. Die intra-assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung im gleichen Ansatz (Tabelle 5).

Inter-Assay Präzision (Run-to-Run): 15,4 %. Die inter-assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung in 20 verschiedenen Ansätzen (Tabelle 6).

Nachweisgrenze (LoB): 444 BTU. 20 Doppelansätze mit Inkubations-Puffer wurden gleichzeitig angesetzt. Mittelwert und Standardabweichung wurden für die Absorptionwerte berechnet. Die kleinste nachweisbare Menge für anti-MAG Autoantikörper wurde durch Addition von zwei Standardabweichungen zum Mittelwert der Absorption berechnet. Die Intersektion dieses Wertes mit der Standardkurve ergab einen Wert von 444 BTU.

Nachweisgrenze (LoQ): 900 BTU. 20 Doppelansätze von Proben mit tiefen anti-MAG Autoantikörpern wurden gleichzeitig angesetzt. Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (CV) wurde von den Absorptionswerten berechnet. Einen CV von 10 % wurde bei einem Titer von 900 BTU erreicht.

Verdünnungslinearität: 147 %. Sieben Serumproben mit erhöhten anti-MAG Autoantikörper Titer wurden mit Inkubations-Puffer 1:1000 bis 1:64000 verdünnt, für eine Stunde bei 18-28 °C stehen gelassen und danach entsprechend der Arbeitsanleitung getestet (Tabelle 7). Es wird vermutet, dass die relativ hohen Abweichungen, in ungefähr 50 % der Proben, aufgrund von Antikörper Aggregaten zustande kommt. Im Allgemeinen enthalten aber pathologische Seren sehr hohe Autoantikörper Titer, sodass dies keinen Einfluss auf die positiv/negativ Diskrimination hat.

Spezifität: Vier Versuchsansätze wurden durchgeführt, um die Spezifität des anti-MAG Autoantikörper ELISA Tests zu ermitteln:

1. Neutralisierung der anti-MAG Autoantikörper: Die Bindung zwischen der mit MAG beschichteten Mikrotiter-Platte und fünf Seren mit hohen anti-MAG Antikörper-Spiegel, wurde durch eine einstündige Vorinkubation mit 1 bis 200 µg/mL MAG und Inkubations-Puffer vor dem

eigentlichen Test mit der ELISA Methode, konzentrationsabhängig gehemmt.

2. Spezifität der anti-MAG Autoantikörper Bindung: Fünf Seren mit mittleren bis hohen anti-MAG Autoantikörper Titern sowie fünf negative Seren wurden auf einer GanglioCombi (EK-GCO) Mikrotiter-Platte getestet welche mit den folgenden Gangliosiden beschichtet war: GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b und GQ1b. Keine der Proben zeigte ein Verhältnis (Ratio) welches grösser als 10 % war. Auf ähnliche Weise wurden sechs Seren mit hohen anti-Ganglioside Autoantikörper Titer (siehe oben), sowie fünf negative Seren auf MAG beschichteten Mikrotiterplatten getestet. Keines dieser pathologischen Seren ergab ein Signal, das höher als 300 BTU war.

3. Vergleich mit der Immunoblot Methode (Western Blot): 127 Seren von Patienten (40 weibliche, 87 männliche, Alter 4-90 Jahren) mit vermutlich anti-MAG verursachten neurologischen Krankheiten wurden mit dem ELISA Test und einer Immunoblot-Methode untersucht. In beiden Methoden wurde aus humanem Zentral-Nervensystem isoliertes MAG eingesetzt. Alle zwölf Seren, die mit der ELISA Methode mittelhohe bis sehr hohe anti-MAG-Autoantikörper Werte zeigten, waren auch mit der Immunoblot Methode deutlich positiv. Von den 115 Proben, die einen anti-MAG-Autoantikörper-Spiegel unter dem Grenzwert (Cut-Off) der ELISA Methode hatten, sind auch 114 mit Immunoblot negativ getestet worden. Ein Serum war leicht positiv mit der Immunoblot Methode (F. Ferracin and A.J. Steck, pers. Kommunikation).

4. Vergleich mit der IFA (Indirect Immunofluorescence Assay) Methode: Es wurden 150 Serumproben von Patienten (Geschlecht und Alter unbekannt) mit diagnostizierter IgM monoklonaler Gammopathie mit Hilfe der ELISA- und einer IFA-Methode getestet. In der IFA Methode wurden Seren mit gefrorenen und Azeton-fixierten Querschnitten von Affen-Ischiasnerven inkubiert. Gebundene anti-MAG Antikörper wurden dann mittels anti-human-IgM Autoantikörper ermittelt. 26 Proben (17,3 %) waren mit beiden Methoden positiv getestet. 115 Patienten (76,7 %) waren mit beiden Methoden negativ. Fünf Proben (3,3 %) sind nur mit der IFA Methode und vier Proben (2,7 %) nur mit der ELISA Methode positiv getestet worden(2).

FRANCAIS

DOMAINE D'UTILISATION

Le test ELISA Autoanticorps anti-MAG a été conçu pour la détermination diagnostique quantitative *in vitro* des auto-anticorps IgM humains dirigés contre la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) dans le sérum. Elle aide à diagnostiquer la neuropathie démyélinisante paraprotéïnémique (NDP) en conjonction avec d'autres résultats cliniques et analytiques (1-7).

PRINCIPE DU DOSAGE

Le test ELISA Autoanticorps anti-MAG repose sur la technique d'amplification enzymatique quantitative de type "sandwich". Les microplaques du test sont préalablement revêtues de MAG hautement purifiée issue de cerveau humain (1). Le calibrateur, les contrôles et le sérum du patient sont incubés dans les puits de la microplaque et les éventuels auto-anticorps anti-MAG présents dans les échantillons se lient à la MAG humaine immobilisée. Après le rinçage des substances non liées, les auto-anticorps anti-MAG sont détectés avec des anticorps marqués à la peroxydase de raifort (HRP) dirigés contre l'IgM humaine. Après une deuxième étape de lavage, dans laquelle le marquage enzymatique non lié est éliminé, une solution de substrat contenant de la tétraméthyl-benzidine (TMB) est ajoutée. Une coloration bleue apparaît proportionnellement à la quantité d'anticorps liés à la MAG humaine immobilisée. Le développement de la coloration est arrêté en ajoutant une solution stop acide (acide sulfurique dilué) qui change la solution bleue en une solution jaune. L'intensité de la couleur est mesurée à 450 nm.

L'absorbance mesurée est proportionnelle au titre d'auto-anticorps anti-MAG humaine présents dans un échantillon donné. Un ensemble de calibrateurs d'auto-anticorps anti-MAG humaine est utilisé pour tracer une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction des unités de titre d'auto-anticorps anti-MAG humaine. Les concentrations d'auto-anticorps anti-MAG humaine dans les échantillons sont calculées en fonction de la courbe d'étalonnage.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

| Réactifs | Quantité | Code | Reconstitution |
|--|--|--------------|---|
| Microplaque 96 puits, précoatée-MAG | 12 barrettes de 8 puits + support | B-MAG-MP | Prête à l'emploi |
| Film adhésif | 3 | | |
| Tampon de lavage concentré (10x) | 1 flacon 100 mL | B-MAG-WB | A reconstituer avec 900 mL d'eau déionisée |
| Tampon d'incubation Avec conservateurs | 1 flacon 100 mL | B-MAG-IB | Prêt à l'emploi |
| Calibrateurs A à D¹ Sérum humain avec conservateurs | 4 flacons | B-MAG-CASET | A reconstituer avec 1 mL de tampon d'incubation |
| Contrôles élevé et bas² Sérum humain avec conservateurs | 2 flacons | B-MAG-CONSET | A reconstituer avec 1 mL de tampon d'incubation |

| Réactifs | Quantité | Code | Reconstitution |
|--|-------------------|-----------|------------------------------------|
| Marqueur enzymatique IgM Anticorps anti-IgM humaine conjugué à la HRP dans un tampon à base de protéines contenant des conservateurs | 1 flacon 11 mL | B-MAG-ELM | Prêt à l'emploi Solution bleue |
| Substrat TMB TMB en tampon citrate | 1 flacon 11 mL | B-TMB | Prêt à l'emploi |
| Solution stop 0,25 M H ₂ SO ₄ | 1 flacon 11 mL | B- STS | Prêt à l'emploi Corrosif |

Tableau 1

¹ Après reconstitution, les calibrateurs A, B, C et D contiennent respectivement 70000, 15000, 3000 et 1000 Unités de Titrage BÜHLMANN (BTU) d'anticorps anti-MAG.

² Les contrôles contiennent des quantités d'anticorps anti-MAG spécifiques à chaque lot. Il convient de se référer aux limites de confiance communiquées avec chaque lot de production.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

| Réactifs Fermés/ Non Entamés | |
|---|---|
| Tous les composants du kit scellés/fermés sont stables à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption imprimée sur les étiquettes | |
| Réactifs Ouverts / Reconstitués | |
| Microplaque | Remplacer immédiatement les barrettes de 8 puits non utilisées dans la pochette contenant le dessiccateur puis la refermer soigneusement. Stable pendant 2 mois à 2-8 °C. |
| Tampon de lavage dilué | Stable pendant 2 mois à 2-8 °C. |
| Calibrateurs | Stables pendant 2 mois à -20 °C. |
| Contrôles | |
| Tampon d'incubation | Stable à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. |
| Marqueur enzymatique | |
| Substrat de TMB | |
| Solution stop | Stable à 18-28 °C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. |

Tableau 2

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision de 20 µL, 100 µL et 1000 µL avec pointes jetables.
- Tubes en polystyrène ou polypropylène jetables, pour la préparation des dilutions.
- Eprouvette graduée de 1000 mL pour la préparation du tampon de lavage à partir du concentré.
- Flacon souple pour tampon de lavage ou dispositif de lavage automatique de microplaques.
- Papier absorbant
- Agitateur orbital pour microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

PRECAUTIONS

Précautions de sécurité

- La microplaque (M-MAG-MP), les calibrateurs (B-MAG-CASET) et les contrôles (B-MAG-CONSET) de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées.
- Solution stop: La solution stop (B-STS) contient de l'acide sulfurique (0,25 M). Le réactif est irritant pour les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Éviter tout contact avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact accidentel avec les yeux ou la peau, il faut impérativement rincer à grande eau.
- Réactifs: Éviter tout contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact accidentel, il faut impérativement rincer à grande eau pour éviter tout risque d'irritation ou de brûlures.
- Pour en savoir plus sur les précautions pour la manipulation et l'élimination des réactifs du kit, nous vous recommandons fortement de consulter l'organisme réglementaire compétent pour votre pays.

Précautions techniques

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Le test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte ou de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- Les puits de la microplaque sont recouverts de cristaux de sel formés lors du processus de production. Ils sont éliminés par le lavage (voir l'étape 3 de la procédure) et n'ont aucune influence sur les résultats.
- Préparer les réactifs avant de démarrer la procédure de dosage. Les réactifs utilisés dans les étapes 3 à 9 doivent être froids (2-8 °C) et maintenus à basse température lors du pipetage et du lavage. Placer le substrat TMB à température ambiante (18-28 °C).
- Étapes 3-9: Utiliser des réactifs froids (2-8 °C) dans toutes ces étapes et les maintenir à basse température lors du pipetage. Recommandation: Préparer le tampon de lavage le soir qui précède la mise en œuvre du dosage et le placer au réfrigérateur pendant une nuit.
- Étapes de lavage 3, 6 et 9: Les étapes de lavage sont cruciales pour éliminer les résidus des puits de la microplaque qui résultent du processus de production (étape 3) ainsi que d'éventuels anticorps non liés (étapes 6 et 9).
 - Toujours réaliser les étapes de lavage avec du tampon de lavage froid (2-8 °C).
 - S'assurer de vider les puits complètement après le dernier cycle de lavage.
- Étape 10: S'assurer d'utiliser du substrat TMB préalablement porté à température ambiante (18-28 °C).
- Étape 11: Bien agiter les microplaques durant l'incubation avec le substrat. Les rpm données (400-600) ne s'appliquent pas à tous les agitateurs de

microplaques. La solution doit s'agiter dans les puits mais sans déborder.

- Pour les laveurs automatiques, BÜHLMANN utilise le mode "plate mode" i.e. chaque étape du processus (distribution ou "dispense") est réalisée séquentiellement pour toutes les barrettes, avant de procéder à l'étape suivante du processus (aspiration).
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Il convient de prendre toutes les précautions requises pour empêcher toute contamination croisée entre réactifs, entre échantillons ou entre puits.
- Les micropuits sont à usage unique.

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

- La procédure requiert <0,1 mL de sang ou <50 µL de sérum.
- Les échantillons lipémiques, hémolytiques et ictériques ne devraient pas être utilisés pour ce dosage. Les échantillons lipémiques peuvent être évités en demandant aux patients de jeûner durant au moins 12 heures avant le prélèvement.
- Prélever le sang dans des tubes (pas d'anticoagulant), prévus à cet usage en évitant l'hémolyse, laisser coaguler à température ambiante (18-28 °C) pendant 1 heure, centrifuger durant 10-30 minutes à environ 1000-2000 x g à température ambiante et recueillir le sérum.
- Conserver les échantillons de sérum à ≤-20 °C. Les échantillons sont stables durant ≥1 année s'ils sont stockés à ≤-20 °C. Éviter les cycles de congélation et de décongélation. Les échantillons congelés devraient être décongelés et homogénéisés par inversion avant leur utilisation.
- Nous recommandons de congeler les prélèvements d'échantillons de patient pour éviter de répéter des cycles de congélation/décongélation.

PROCEDURE

1. Diluer tous les échantillons de patient à analyser au 1/1000e avec du tampon d'incubation. Utiliser 2 µL de sérum + 2000 µL de tampon d'incubation. Mélanger vigoureusement au vortex et laisser les échantillons dilués pendant une heure à 18-28 °C. Placer les échantillons ainsi que les calibrateurs et contrôles reconstitués pendant 10 minutes sur de la glace avant le pipetage de l'étape 4.
 2. Préparer un cadre de plaque avec le nombre de barrettes adéquat pour tester les calibrateurs, les contrôles et les échantillons de patient. Resceller immédiatement les barrettes restantes dans le sachet film contenant les paquets de dessiccatifs. Conserver au réfrigérateur.
- Remarque: Utiliser des réactifs froids dans les étapes 3 à 9.*
3. Laver les puits revêtus quatre fois avec au moins 300 µL de tampon de lavage froid! par puits. Vider les puits et taper fermement la plaque sur le papier absorbant pour éliminer complètement le liquide restant.

- 4a. Distribuer 100 µL de tampon d'incubation (blanc) en double dans les puits A1 et A2.
Distribuer 100 µL de calibrateur A en double dans les puits B1 et B2.
Distribuer 100 µL de calibrateur B en double dans les puits C1 et C2.
Distribuer 100 µL de calibrateur C en double dans les puits D1 et D2.
Distribuer 100 µL de calibrateur D en double dans les puits E1 et E2.
- 4b. Distribuer 100 µL de contrôle bas en double dans les puits F1 et F2.
Distribuer 100 µL de contrôle élevé en double dans les puits G1 et G2.
- 4c. Distribuer 100 µL d'échantillons dilués en double dans les puits suivants.
5. Couvrir la microplaque à l'aide du film adhésif fourni et incubé à 2-8 °C pendant 2 heures (±5 minutes).
6. Retirer le film adhésif de la plaque. Vider puis laver les puits quatre fois avec au moins 300 µL de tampon de lavage froid (2-8 °C) par puits. Vider les puits et frapper fermement la plaque contre le papier absorbant pour éliminer complètement le tampon de lavage.
7. Ajouter 100 µL de marqueur enzymatique dans chaque puits.
8. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incubé à 2-8 °C pendant 2 heures (±5 minutes).
9. Retirer le film adhésif. Vider puis laver quatre fois chaque puits avec ≥300 µL de tampon de lavage froid. Vider les puits et les sécher en tapant fermement la microplaque sur du papier absorbant.

Remarque: Ajuster la solution de substrat TMB à température ambiante (18-28 °C).

10. Ajouter 100 µL de substrat TMB dans chaque puits.
11. Recouvrir la plaque d'un film adhésif, incubé la plaque sur un agitateur de plaques orbital à 400-600 rpm pendant 30 ± 2 minutes à 18-28 °C. Protéger la plaque de la lumière directe.
12. Ajouter 100 µL de solution stop dans chaque puits. Passer à l'étape 13 dans les 30 minutes qui suivent.
13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

CONTROLE DE QUALITE

Il est nécessaire de bien comprendre ces instructions d'utilisation pour obtenir des résultats fiables. Ce but ne sera atteint que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

Comme il n'existe pas de sérum de contrôle pour les anticorps anti-MAG commercialement disponible, nous recommandons l'utilisation d'un pool des sérums positifs et négatifs comme référence interne et contrôle qualité.

Tous les contrôles doivent être inclus dans les intervalles de confiance établis (BTU). Les intervalles de confiance pour les contrôles sont spécifiques au lot et inscrites sur la fiche de données de QC fournie avec le kit.

Les caractéristiques de performances doivent être incluses dans les limites établies. Si ces caractéristiques ne sont pas

conformes aux limites établies et que la répétition permet d'exclure les erreurs de manipulation, vérifier les conditions suivantes : i) Tous les réactifs utilisés dans les étapes 3 à 10 ont-ils été conservés à 2-8 °C ? ii) Précision des pipettes, des thermomètres et des chronomètres iii) Paramètres du dispositif de lecture et de lavage ELISA, iv) Date de péremption des réactifs v) Conditions de stockage et d'incubation vi) Couleur de la solution de substrat TMB (elle doit être incolore) vii) Pureté de l'eau.

STANDARDISATION

Les calibrateurs de cette trousse ont été standardisés par rapport à un pool de référence interne constitué de plus de 10 sérums humains présentant des taux d'auto-anticorps anti-MAG, respectivement bas, moyens ou élevés. Les taux et la spécificité de chaque sérum du pool de référence ont été préalablement analysés par immuno-blots anti-MAG. Les BÜHLMANN Titer Units (BTU) (ou unités de titrage BÜHLMANN) ont été établies comme suit:

- Les échantillons normaux des donneurs ont été testés selon le protocole anti-MAG ELISA standard.
- Des échantillons de dilutions en série du pool de référence ont été testés au cours du même essai.
- La dilution de l'échantillon du pool de référence immédiatement inférieure à la valeur seuil des échantillons normaux correspond au taux du pool de référence, exprimé en BÜHLMANN Titer Units (BTU).

REMARQUE: Les valeurs sériques dépendent de la méthode de dosage utilisée, particulièrement de la spécificité et de la valeur seuil établies pour cette même méthode. Les titres obtenus au moyen de deux méthodes différentes ne peuvent donc être comparés directement.

RESULTATS

Courbe d'étalonnage

Enregistrer l'absorbance à 450 nm pour chaque puits pour tracer une courbe d'étalonnage à partir de la moyenne des deux valeurs de chaque calibrateur, en soustrayant la DO moyenne des blancs de chaque calibrateur. Il est recommandé d'utiliser un logiciel pour calculer la courbe d'étalonnage et déterminer la concentration des échantillons, en utilisant un ajustement logistique à 4 paramètres (4 PL).

Echantillons et Contrôles

- Enregistrer l'absorbance à 450 nm de chaque puits d'échantillon et de témoin. Soustraire la DO moyenne des blancs de la moyenne des deux valeurs de chaque échantillon et contrôle.
- Repérer les valeurs d'absorbance des échantillons et des contrôles sur l'axe vertical. Tracer une droite horizontale coupant la courbe d'étalonnage. Lire la concentration sur l'axe horizontal.

Si le lecteur de microplaques ne permet pas la lecture d'absorbances supérieures à 2 ou à l'absorbance du calibrateur le plus haut (calibrateur A), une deuxième lecture à 490 ou 492 nm est recommandée (filtre de référence à 600 ou 620 nm, si disponible). Dans ce cas, établir une deuxième courbe d'étalonnage à l'aide des mesures d'absorbance des calibrateurs à 490 ou 492 nm. La concentration des échantillons hors limite à 450 nm est ensuite lue à l'aide de la nouvelle courbe d'étalonnage,

selon la même méthode décrite ci-dessus. Les lectures à 490 ou 492 nm de doivent pas remplacer les lectures à 450 nm.

Remarque: Les résultats présentés dans le tableau 3 et la figure 1 sont des exemples. Le calibrateur et les contrôles doivent être utilisés dans chaque série de dosage.

Résultats et courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Une courbe d'étalonnage doit être tracée pour chaque nouvelle série d'échantillons à doser.

LIMITES

1. Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations résultant de l'examen clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.
2. Le test ELISA Autoanticorps anti-MAG n'a pas été validé pour les échantillons de plasmaphérese.

INTERVALLES DES REFERENCES VALEURS SEUIL (CUT-OFF)

La concentration normale d'auto-anticorps anti-MAG dans le sérum humain a été évaluée en analysant les échantillons sanguins de donneurs asymptomatiques (hommes et femmes âgés de 18 à 70 ans). 150 échantillons ont été testés d'après la procédure standard. Voir table 4 pour les résultats obtenus.

REMARQUE: Ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif. Il est recommandé à chaque laboratoire de définir ses propres valeurs normales pour sa propre population de patients.

Cut-off/valeur seuil proposé(e)

La moyenne +3 écarts types donne une valeur seuil technique de 729 BTU. Pour des raisons pratiques, nous recommandons d'utiliser une valeur seuil de 1000 BTU, correspondant au calibrateur le plus bas (calibrateur D) de la courbe d'étalonnage.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision intra-essai: 6,5 %. La précision intra-essai a été calculée à partir des mesures de 20 duplicats de chaque échantillon lors d'un seul et même essai (table 5).

Précision inter-essai: 15,4 %. La précision inter-essai a été calculée à partir des résultats de 20 duplicats de chaque échantillon lors de 20 essais différents (table 6).

Limite de blanc (LoB): 444 BTU. 20 duplicats du tampon d'incubation ont été mesurés lors d'un seul et même essai. La moyenne et l'écart type des valeurs d'absorbance ont été calculés. La dose détectable minimale d'anticorps anti-MAG a été définie à 444 BTU en additionnant 2 écarts types à l'absorbance moyenne puis en déterminant le titre correspondant à cette valeur d'absorbance à l'aide de la courbe d'étalonnage obtenue lors du même essai.

Limite de quantification (LoQ): 900 BTU. 20 duplicats de faibles titres d'auto-anticorps anti-MAG ont été testés lors d'un seul et même essai. La moyenne, l'écart type (SD) et le coefficient de variation (CV) des valeurs d'absorbance ont été calculés. Un taux de 900 BTU a été obtenu, avec un CV inférieur à 10 %.

Linéarité de dilution: 147 %. Sept échantillons sériques humains présentant des taux élevés d'auto-anticorps anti-MAG ont été dilués du 1000^{ème} au 64000^{ème} (de 1:1000 à 1:64000) avec du le tampon d'incubation, puis incubés durant une heure à 18-28 °C puis dosés selon le protocole standard (table 7). Il est probable que la haute déviation observée dans environ 50 % des échantillons soit due à l'agrégation d'anticorps. En général, les sérums pathologiques présentent des taux d'auto-anticorps très élevés. Cette déviation n'a en conséquence pas d'influence sur l'interprétation des résultats.

Spécificité: Quatre types d'expérimentation ont été pratiqués afin d'évaluer la spécificité du test Autoanticorps anti-MAG ELISA:

1. Neutralisation des auto-anticorps anti-MAG: Cinq sérums présentant des taux élevés d'auto-anticorps anti-MAG ont été inhibés dans leur fixation à la microplaque coatée de MAG de manière concentration-dépendante après préincubation pendant 1 heure dans du tampon d'incubation supplémenté de 1 à 200 µg/mL de MAG avant analyse en ELISA.

2. Spécificité de liaison des auto-anticorps anti-MAG: Cinq sérums présentant des taux moyens à élevés d'auto-anticorps anti-MAG ainsi que cinq sérums testés négatifs à l'aide du test anti-MAG ont été analysés au moyen d'une microplaque GanglioCombi (EK-GCO) revêtue GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b et GQ1b. Aucun échantillon n'a présenté de rapport supérieur à 10 %. De manière similaire, six sérums avec de hauts taux d'auto-anticorps anti-Ganglioside (voir plus haut) ainsi que cinq sérums négatifs ont été testés sur des microplaques revêtues de MAG. Aucun de ces échantillons «pathologiques» n'a présenté un signal supérieur à 300 BTU.

3. Comparaison avec la méthode immunoblot (Western Blot): 127 échantillons sériques (40 femmes, 87 hommes âgés de 4 à 90 ans) atteints de neuropathologies soupçonnées d'être causées par des auto-anticorps anti-MAG ont été testés par la méthode ELISA et par immunoblot. La glycoprotéine MAG, isolée du système nerveux central (SNC) humain, a été utilisée avec les deux méthodes. Tous les douze sérums présentant des taux d'auto-anticorps anti-MAG moyens à très hauts par ELISA ont également été positifs par immunoblot. 114 des 115 échantillons présentant un taux d'auto-anticorps anti-MAG sérique inférieur à la valeur seuil par ELISA ont également été négatifs par immunoblot alors qu'un seul échantillon est resté faiblement positif par immunoblot (F. Ferracin and A.J. Steck, résultats non publiés).

4. Comparaison avec la méthode IFA (Indirect Immunofluorescence Assay): Les sérums de 150 patients (de sexe et âge inconnus) atteints de gammopathies monoclonales d'IgM ont été testés par ELISA et IFA. Dans la méthode IFA, les sérums ont été incubés sur des sections de nerf sciatique de singe congelées et fixées à l'acétone. Les auto-anticorps anti-MAG ont été détectés par anticorps FITC-marqués dirigés contre les IgM humaines. 26 patients (17,3 %) ont été positifs et 115 (76,7 %) étaient négatifs avec les deux méthodes, alors que cinq sérums (3,3 %) étaient positifs par la méthode IFA uniquement et quatre sérums (2,7 %) étaient positifs par la méthode ELISA uniquement (2).

USO

Il dosaggio Autoanticorpi anti-MAG ELISA è un test diagnostico quantitativo *in vitro* per la determinazione degli auto-anticorpi IgM umani diretti verso la glicoproteina associata alla mielina (MAG) nel siero. Serve come ausilio nella diagnosi della neuropatia demielinizzante paraproteinemica (PDN) in aggiunta ad altri risultati clinici e di laboratorio (1-7).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il dosaggio Autoanticorpi anti-MAG ELISA utilizza la tecnica per immunodosaggi quantitativi tipo sandwich amplificato enzimaticamente. Le micropiastre del test sono pre-coattate con MAG di cervello umano altamente purificata (1). Un calibratore, i controlli e i sieri dei pazienti sono incubati nei pozzetti della piastra e gli eventuali auto-anticorpi anti-MAG presenti nei campioni si legano alla MAG umana immobilizzata. Dopo l'eliminazione delle sostanze libere mediante lavaggio, gli auto-anticorpi anti-MAG vengono rilevati con anticorpi contro le IgM umane marcati con perossidasi di rafano (HRP). Dopo un secondo lavaggio, nel quale viene rimosso il marcatore enzimatico libero, viene aggiunta una soluzione di substrato contenente tetrametilbenzidina (TMB). Si sviluppa un colore blu proporzionale alla quantità di anticorpi legati alla MAG umana immobilizzata. Lo sviluppo di colore viene interrotto mediante l'aggiunta di una soluzione bloccante acida (acido solforico diluito) che fa virare la soluzione da blu a giallo. L'intensità del colore viene misurata a 450 nm.

L'assorbanza misurata è proporzionale al titolo di auto-anticorpi anti-MAG umana presenti in un dato campione. Un set di calibratori di auto-anticorpi anti-MAG umana viene utilizzato per registrare una curva di calibrazione dell'assorbanza in funzione delle unità titolate di auto-anticorpi anti-MAG umana. Le concentrazioni di auto-anticorpi anti-MAG umana nei campioni vengono calcolate in base alla curva di calibrazione.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

| Reagenti | Quantità | Codice | Ricostituzione |
|---|--|--------------|---|
| Micropiastra 96 pozzetti pre-coattati con MAG umana | Strips da 12 x 8-pozzetti con supporto | B-MAG-MP | Pronto all'uso |
| Foglio sigillante per la piastra | 3 fogli | | |
| Tampone di lavaggio concentrato (10x) | 1 flacone 100 mL | B-MAG-WB | Diluire con 900 mL di acqua deionizzata |
| Tampone d'incubazione con Con conservanti | 1 flacone 100 mL | B-MAG-IB | Pronto all'uso |
| Calibratore A a D¹ Siero umano con conservanti | 4 flaconi | B-MAG-CASET | Aggiungere 1 mL di Tampone di Incubazione |
| Controllo basso ed alto² Siero umano con conservanti | 2 flaconi | B-MAG-CONSET | Aggiungere 1 mL di Tampone di Incubazione |

| Reagenti | Quantità | Codice | Ricostituzione |
|---|--------------------|-----------|---|
| Marcato enzimatico IgM Anticorpo anti-IgM umane coniugato a HRP in un tampone a base proteica con conservanti | 1 flacone 11 mL | B-MAG-ELM | Pronto all'uso Soluzione Blu |
| Substrato di TMB TMB in un tampone citrato | 1 flacone 11 mL | B-TMB | Pronto all'uso |
| Soluzione stoppante 0,25 M di acido solforico | 1 flacone 11 mL | B-ST5 | 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 Titolate BÜHLMANN (BTU) di anticorpi anti-MAG.

² I Controlli contengono quantitativi lotto-specifici di anticorpi MAG. Fare riferimento ai fogli per i controlli per le concentrazioni esatte.

CONSERVAZIONE ED EMI-VITA DEI REAGENTI

| Reagenti Sigillati / (Non Aperti) | |
|---|---|
| Tutti i component del kit sigillati/non aperti sono stabili a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sulle etichette. | |
| Reagenti Aperti / Ricostituiti | |
| Micropiastra | Riporre le strip non utilizzate immediatamente nella busta che contiene il dessiccante e risigillare completamente chiudendo la zip. Conservare fino a 2 mesi a 2-8 °C. |
| Tampone di lavaggio diluito | Conservare fino a 2 mesi a 2-8 °C. |
| Calibratori | Conservare fino a 2 mesi a -20 °C. |
| Controlli | |
| Tampone d'incubazione | Conservare a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sulle etichette. |
| Marcato enzimatico IgM | |
| Substrato di TMB | |
| Soluzione stoppante | Conservare a 18-28 °C fino alla data di scadenza indicata sulle etichette. |

Tabella 2

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso: 20 µL, 100 µL e 1000 µL.
- Provette monouso di polipropilene o polistirene per la preparazione di diluizioni del campione.
- Beuta a cilindro da 1000 mL per la diluizione del tampone di lavaggio concentrato.
- Flacone dosatore per il tampone di lavaggio o lavatore automatico per micropiastre.
- Carta assorbente.
- Agitatore orbitale per micropiastre.
- Lettore di micropiastra per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm.

PRECAUZIONI

Precauzioni di sicurezza

- La micropiastra (B-MAG-MP), il calibratore (B-MAG-CASET) ed i controlli di questo kit (B-MAG-CONSET) contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio utilizzando le dovute precauzioni.
- **Soluzione stoppante:** La soluzione stoppante (B-ST5) contiene acido solforico (0,25 M). Il reagente è irritante per gli occhi, per la pelle e per le membrane mucose. Evitare il contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti. In caso di contatto con gli occhi o con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua.
- **Reagenti:** Evitare il contatto dei reagenti con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondanti quantità di acqua, in caso contrario si possono sviluppare irritazione / ustioni.
- In merito alle precauzioni adeguate per lo smaltimento di reagenti del kit, consigliamo vivamente di consultare prima le normative locali speciali del proprio paese.

Precauzioni tecniche

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- **Residui rimasti nei pozzetti** sono causati dal processo di produzione. Questi residui vengono completamente eliminati dai lavaggi durante la procedura descritta e non compromettono in alcun modo i risultati. (fare riferimento al punto 3 delle istruzioni per l'uso).
- **Preparare i reagenti prima di iniziare la procedura del test.** I reagenti utilizzati nei **punti 3-9** devono essere freddi (2-8 °C) e devono essere mantenuti freddi mentre si pipetta e durante il lavaggio. Mettere il substrato TMB a temperatura ambiente (18-28 °C).
- **Punti 3-9:** Usare reagenti freddi (2-8 °C) per tutti questi punti e mantenerli freddi mentre si pipetta. Raccomandazione: preparare il tampone di lavaggio la sera prima di eseguire il test e riporlo in frigorifero fino al giorno seguente.
- **Punti di lavaggio 3, 6 e 9:** Le fasi di lavaggio sono essenziali per rimuovere dai pozzetti della micropiastra i residui che derivano dal processo di produzione (punto 3), nonché eventuali anticorpi liberi (punti 6 e 9).
→ Eseguire sempre il lavaggio con tampone di lavaggio freddo (2-8 °C).
→ Dopo l'ultimo ciclo di lavaggio delle strip, assicurarsi che i pozzetti siano completamente vuoti.
- **Punto 10:** Assicurarsi prima dell'uso che il substrato TMB raggiunga 18-28 °C.
- **Punto 11:** Assicurarsi una buona agitazione della micropiastra durante l'incubazione con il Substrato TMB bene. A seconda del tipo di agitatore è consigliata una velocità di 400-600 rpm. La micropiastra deve

essere agitata efficacemente, ma facendo in modo di evitare la fuoriuscita di liquido.

- Usando dispositivi automatici per lavaggio/ aspirazione della micropiastra, BÜHLMANN consiglia l'utilizzo della modalità: "plate mode"; dispensazione sequenziale in tutte le strip e successiva aspirazione.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Fare ogni tentativo per assicurarsi che tra i reagenti, i campioni o tra i pozzetti non vi siano contaminazioni incrociate.
- I micropozzetti non possono essere riutilizzati.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

- La procedura richiede <0,1 mL di sangue o <50 µL di siero.
- Campioni lipemici, emolizzati ed iterici, non devono essere usati in questa analisi. I campioni lipemici possono essere evitati chiedendo ai pazienti di digiunare per almeno 12 ore prima del prelievo del campione.
- Prelevare i campioni di sangue in provette semplici (non anticoagulante), evitando l'emolisi, lasciare coagulare per un'ora a temperatura ambiente (18-28 °C), centrifugare per 10-30 minuti a circa 1000-2000 x g a temperatura ambiente e prelevare il siero.
- Conservare i campioni di siero a ≤-20 °C. I campioni sono stabili per ≥1 anno se conservati a ≤-20 °C. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo. I campioni congelati devono essere scongelati e mescolati completamente capovolgendoli o scuotendoli leggermente prima dell'utilizzo.
- Raccomandiamo di congelare aliquote di campioni del paziente per evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.

DOSAGGIO

1. Diluire tutti i campioni del paziente da analizzare 1:1000 con tampone di incubazione. Usare 2 µL di siero + 2000 µL di tampone di incubazione. Miscelare accuratamente con il vortex e lasciare i campioni diluiti per un'ora a 18-28 °C. Mettere i campioni e i calibratori ricostituiti e i controlli per 10 minuti in ghiaccio prima di pipettarli nel punto 4.
2. **Preparare il modulo di supporto per micropiastre** con il numero necessario di strip per analizzare i calibratori, i controlli e i campioni del paziente. Risigillare **immediatamente** le strip rimanenti nella busta di alluminio assieme alle confezioni di essiccante. Conservarle refrigerate.

Nota: Usare reagenti freddi nei punti da 3 a 9.

3. Lavare i pozzetti rivestiti quattro volte usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio freddo! per pozzetto. Svotare i pozzetti e picchiettare fermamente la piastra su carta assorbente per rimuovere completamente il liquido rimanente.

- 4a. Dispensare 100 µL di soluzione d'incubazione (come bianco) in duplicato nei pozzetti A1+A2
Dispensare 100 µL del calibratore A in duplicato nei pozzetti B1+B2.
Dispensare 100 µL del calibratore B in duplicato nei pozzetti C1+C2.
Dispensare 100 µL del calibratore C in duplicato nei pozzetti D1+D2.
Dispensare 100 µL del calibratore D in duplicato nei pozzetti E1+E2.
- 4b. Dispensare 100 µL del controllo basso in duplicato nei pozzetti F1+F2.
Dispensare 100 µL del controllo alto in duplicato nei pozzetti G1+G2.
- 4c. Dispensare 100 µL di ciascun campione diluito in duplicato nei pozzetti successivi.
5. Coprire la piastra con un foglio sigillante ed incubare per 2 ore (± 5 min) a 2-8 °C.
6. Rimuovere il foglio sigillante dalla piastra. Svuotare i pozzetti e lavare quattro volte usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio freddo (2-8 °C) per pozzetto. Svuotare i pozzetti e picchiettare fermamente la piastra su carta assorbente per rimuovere completamente il tampone di lavaggio.
7. Aggiungere 100 µL di marcato enzimatico IgM a tutti i pozzetti.
8. Coprire la piastra con un foglio sigillante ed incubare per 2 ore (± 5 min) a 2-8 °C.
9. Togliere il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare quattro volte utilizzando almeno 300 µL di tampone di lavaggio a freddo (2-8 °C) per pozzetto. Svuotare i pozzetti e picchiettarli su carta assorbente.
- Nota: equilibrare la soluzione di substrato TMB a temperatura ambiente (18-28 °C).*
10. Aggiungere 100 µL di soluzione di substrato TMB ad ogni pozzetto.
11. Coprire la piastra con un foglio sigillante per piastra, incubare la piastra in un agitatore orbitale per piastra a 400-600 rpm per 30 ± 2 minuti a 18-28 °C. Proteggere la piastra dalla luce solare diretta.
12. Aggiungere a tutti i pozzetti 100 µL di soluzione stoppante. Passare al punto 13 entro 30 minuti.
13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastre.

CONTROLLO DI QUALITÀ

È necessario comprendere bene le presenti istruzioni per l'uso per arrivare a risultati affidabili, che si otterranno solo adottando tecniche di laboratorio precise (le attuali linee guida di buona pratica di laboratorio) e seguendo con attenzione le istruzioni per l'uso.

Poiché non esiste in commercio un siero di controllo per gli anticorpi anti-MAG, raccomandiamo l'uso di un pool di sieri positivi e di uno di sieri negativi per il controllo di qualità interno.

Tutti i controlli devono rientrare negli intervalli di confidenza stabiliti (BTU). Gli intervalli di confidenza dei controlli sono specifici per lotto e sono indicati nella scheda informativa di controllo qualità inclusa nel kit.

Le caratteristiche di prestazione devono rientrare nei limiti stabiliti. Se tali caratteristiche non sono conformi ai limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude problemi di manipolazione, controllare i seguenti aspetti: i) tutti i reagenti utilizzati nei punti 3-10, sono stati tenuti a 2-8 °C? ii) accuratezza delle pipette, dei termometri e dei cronometri, iii) impostazioni del lavatore e del lettore ELISA, iv) data di scadenza dei reagenti v) condizioni di conservazione e di incubazione vi) colore della soluzione di substrato TMB (deve essere incolore) vii) purezza dell'acqua.

STANDARDIZZAZIONE

I calibratori del kit sono standardizzati vs. un pool interno di riferimento. Il pool di riferimento consiste in più di dieci sieri umani contenenti rispettivamente, titoli, bassi, medi ed elevati di anticorpi anti-MAG. Titoli e specificità di ciascun siero nel pool di riferimento sono stati inizialmente analizzati con immunoblot anti-MAG.

Le Unità Titolate BÜHLMANN (BTU) sono state stabilite come segue:

- Campioni normali sono stati dosati secondo la procedura Autoanticorpi anti-MAG ELISA.
- Campioni diluiti serialmente appartenenti al pool di riferimento sono stati dosati nella stessa seduta.
- La diluizione all'interno della quale rientra il pool di campioni di riferimento in prossimità del cut-off corrisponde al titolo del pool di riferimento.

Nota: Valori titolati di siero dipendono dal metodo di dosaggio e, in particolare, dalla specificità dei valori di cut-off stabiliti con un unico metodo di dosaggio. Quindi, valori titolati ottenuti con metodi diversi non possono essere comparati direttamente.

RESULTATI E CALCOLO

Curva standard

Registrare l'assorbanza a 450 nm di ogni pozzetto, per costruire una curva di calibrazione in base alla media dei duplicati del calibratore, sottraendo la densità ottica (OD) media del bianco da ogni calibratore. Si raccomanda di usare un programma software per calcolare la curva di calibrazione e per determinare la concentrazione dei campioni, usando un modello logistico a 4 parametri (4 PL).

Campioni e controlli

- Registrare l'assorbanza a 450 nm per ogni pozzetto di campione e di controllo. Sottrarre la OD media del bianco dalla media dei valori duplicati di ogni campione e controllo.
- Localizzare i valori di assorbanza dei campioni e dei controlli sull'asse verticale, tracciare una linea orizzontale che intersechi la curva calibratore e leggere dall'asse orizzontale.

Se il lettore di micropiastre non è in grado di leggere assorbanze maggiori di 2 o superiori all'assorbanza dello calibratore più elevato (calibratore A), si consiglia una seconda lettura alla lunghezza d'onda di 490 o 492 nm (sono disponibili filtri di riferimento a 600 o 620 nm). In questo caso, procedere alla costruzione di una seconda curva standard con le letture delle assorbanze di tutti gli calibratori a 490 o 492 nm. La concentrazione dei

campioni fuori scala a 450 nm vengono lette dalla nuova curva standard come più sopra descritto. Le letture a 490 o 492 nm non devono sostituire le letture in scala a 450 nm.

Nota: I risultati presentati in tabella 3 e in figura 1 sono esempi. Si devono usare calibratore e controlli per ogni singolo dosaggio.

Risultati e curva di calibrazione sono forniti a scopo esclusivamente dimostrativo. La curva di calibrazione deve essere creata per ogni set di campioni da analizzare.

LIMITI DELLE PRESTAZIONI

1. I risultati del test vanno interpretati insieme alle informazioni derivanti dagli studi epidemiologici, dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.
2. Il dosaggio Autoanticorpi anti-MAG ELISA non è stato validato per campioni di plasmaferesi.

VALORI DI CUT-OFF E STANDARDIZZAZIONE

La frequenza degli auto-anticorpi anti-MAG nei sieri umani normali è stata determinata utilizzando campioni di sangue da volontari asintomatici (donne ed uomini adulti dai 18 ai 70 anni). Sono stati dosati 150 campioni secondo la metodica. In tabella 4 sono riportati i risultati ottenuti.

Nota: Questi range devono essere utilizzati solo come linee guida. Si consiglia ad ogni laboratorio di stabilire i propri range attesi per la propria popolazione di pazienti.

Cut-off titolati suggeriti

La media +3SD produrre un valore di cut-off tecnico di 729 BTU. Per ragioni pratiche, consigliamo l'utilizzo di un valore di cut-off di 1000 BTU, corrispondente allo calibratore più basso (=calibratore D) nella curva standard.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Precisione Intra-Dosaggio (Intra-Seduta): 6,5 %. La precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori ottenuti in un'unica seduta (tabella 5).

Precisione Inter-Dosaggio (Da Seduta a Seduta): 15,4 %. La precisione inter-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori ottenuti in 20 sedute diverse (tabella 6).

Limite del Bianco (LoB): 444 BTU. 20 duplicati di tampone d'incubazione sono stati determinati in un unico run. Valori medi e di deviazione standard sono stati calcolati per i valori d'assorbanza. La dose minimale detestabile d'anticorpi anti-MAG di 444 BTU è stata calcolata aggiungendo due deviazioni standard alla media d'assorbanza ed intersezionando questo valore con la curva standard ottenuto in questo run.

Limite di Quantificazione (LoQ): 900 BTU. 20 duplicati di lievi concentrazioni d'auto-anticorpi anti-MAG sono stati deluminati in un unico run. Valori medi di deviazione standard (SD) e coefficiente di variazione (CV) sono stati calcolati con i valori d'assorbanza. Abbiamo ritrovato 900 BTU risultando con una CV di 10 %.

Linearità/Parallelismo di Diluzione: 147 %. Sette sieri umani contenenti alte concentrazioni di anticorpi anti-

MAG sono stati diluiti con tampone d'incubazione 1:1000 fino a 1:64000, lasciati per una ora a 18-28 °C ed in seguito determinanti seguendo le istruzioni di procedura. Si considera che la deviazione relativamente elevata in ca. 50 % dei campioni sia dovuta a delle aggregazioni di anticorpi. In genere, campioni patologici mostrano concentrazioni altamente elevate, e dunque non ha un afflusso nella discriminazione tra positivo e negativo (tabella 7).

Specificità: Sono stati effettuati quattro set di esperimenti per determinare la specificità del dosaggio Autoanticorpi anti-MAG ELISA:

1. Neutralizzazione degli auto-anticorpi anti-MAG: cinque sieri con titoli elevati d'anti-MAG possono essere inibiti dal legarsi alle micropiastre coattate con MAG in modo dipendente dalla concentrazione se preincubati per un'ora con il tampone d'incubazione fornito e da 1 a 200 µg/mL di MAG prima del dosaggio con ELISA.

2. Specificità del legame degli auto-anticorpi anti-MAG: cinque sieri di medi ed alti titer d'anticorpi anti-MAG e cinque sieri negativi sono stati determinati su una micropiastre GanglioCombi (EK-GCO) coattata con GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b e GQ1b. Nessuno dei campioni ha mostrato rapporti maggiori a 10 %. Similmente, sei sieri con alte concentrazioni d'auto-anticorpi anti-gangliosidi (veda sopra) e cinque sieri negativi sono stati determinati su micropiastre coattate con MAG. Nessuno di questi campioni positivi ha dato segnali maggiori a 300 BTU.

3. Comparazione con immunoblot (Western Blot): 127 campioni di sieri (40 femmine; 87 maschi; età 4-90 anni) con malattie neurologiche presumibilmente causate da auto-anticorpi anti-MAG sono stati testati rispettivamente con il metodo ELISA e Western Blot. MAG isolata dal sistema nervoso centrale umano (CNS) è stata utilizzata in entrambi i metodi. Tutti e dodici i sieri che presentano titoli da medi a molto elevati di auto-anticorpi anti-MAG IgM nella procedure ELISA si sono rivelati chiaramente positivi se analizzati con immunoblot. 114 sieri su 115 che presentavano titoli di anticorpi IgM anti-MAG al di sotto del valore di cut-off ELISA erano negativi anche se analizzati con immunoblot, mentre un siero era leggermente positivo solo con il metodo immunoblot. (F. Ferracin and A.J. Steck, risultati non pubblicati).

4. Comparazione con il dosaggio ad immunofluorescenza indiretta (IFA): I sieri di 150 pazienti (sesso ed età ignoti) con gammopatie monoclonali IgM diagnosticate sono stati testati rispettivamente con un metodo ELISA ed un metodo IFA. Nel metodo IFA, i sieri sono stati incubati su sezioni di nervo sciatico di scimmia congelato e fissato con acetone; gli anticorpi legati anti-MAG erano stati individuati con anticorpi anti-IgM umane marcati con FITC. 26 pazienti (17,3 %) erano positivi e 115 pazienti (76,7 %) erano negativi con entrambi i metodi, mentre cinque sieri (3,3 %) erano positivi solo con il metodo IFA e quattro sieri (2,7 %) erano positivi solo con il metodo ELISA, rispettivamente (2).

INDICACIONES DE USO

El ELISA de Autoanticuerpos anti-MAG ha sido diseñado para realizar la determinación diagnóstica *in vitro* cuantitativa de auto-anticuerpos IgM humanos dirigidos contra la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) en el suero. Sirve como ayuda, junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio, en el diagnóstico de la neuropatía desmielinizante asociada a paraproteínas (PDN) (1-7).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

El enzimoimmunoanálisis (ELISA) de Autoanticuerpos anti-MAG utiliza la técnica cuantitativa de inmunoanálisis tipo sandwich. Las placas de microtitulación de la prueba vienen previamente recubiertas con MAG altamente purificada procedente de cerebro humano (1). El calibrador, los controles y los sueros de paciente se incuban en los pocillos de microtitulación, con lo que cualquier auto-anticuerpo anti-MAG presente en las muestras se une a la MAG humana inmovilizada. Tras un lavado para retirar las sustancias no unidas, los auto-anticuerpos anti-MAG se detectan con anticuerpos frente a IgM humana marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un segundo paso de lavado en el que se retira el marcador enzimático no unido, se añade una solución sustrato que contiene tetrametilbencidina (TMB). Se desarrolla así una coloración azul proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos a la MAG humana inmovilizada. El desarrollo de color se detiene añadiendo una solución de parada ácida (ácido sulfúrico diluido) que hace virar la solución azul hacia el amarillo. Se mide entonces la intensidad del color a 450 nm.

La absorbancia medida es proporcional al título de autoanticuerpos anti-MAG humana presente en una determinada muestra. Se utiliza un conjunto de calibradores de auto-anticuerpos anti-MAG humana para trazar una curva de calibración de la absorbancia frente al título de autoanticuerpos anti-MAG humana. Las concentraciones de auto-anticuerpos anti-MAG humana presentes en las muestras se calculan en base a esa curva de calibración.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

| Reactivos | Cantidad | Código | Reconstitución |
|--|------------------------------------|-------------|---------------------------------------|
| Microplaca 96 pocillos recubiertos con MAG humana | 12 tiras de 8 pocillos con soporte | B-MAG-MP | Listo para usar |
| Sellador de placas | 3 unidades | | |
| Tampón de lavado concentrado (10x) | 1 botella 100 mL | B-MAG-WB | Diluir con 900 mL de agua desionizada |
| Tampón de incubación Con conservantes | 1 botella 100 mL | B-MAG-IB | Listo para usar |
| Calibrador A a D¹ Suero humano con conservantes | 4 viales | B-MAG-CASET | Añadir 1 mL de tampón de incubación |

| Reactivos | Cantidad | Código | Reconstitución |
|---|--------------|--------------|--|
| Control bajo y alto² Suero humano con conservantes | 2 viales | B-MAG-CONSET | Añadir 1 mL de tampón de incubación |
| Marcada enzimáticamente IgM Anticuerpo anti-IgM humana conjugado con HRP en un tampón proteico con conservantes | 1 vial 11 mL | B-MAG-ELM | Listo para usar Solución azul |
| Sustrato de TMB TMB en tampón citrato | 1 vial 11 mL | B-TMB | Listo para usar |
| Solución de parada Ácido sulfúrico 0,25 M | 1 vial 11 mL | B- STS | Listo para usar Agente corrosivo |

Tabla 1

¹ Después de la reconstitución, los calibradores A, B, C y D contienen respectivamente 70000, 15000, 3000 y 1000 unidades de titulación BÜHLMANN (BTU) de anticuerpos anti-MAG.

² Los controles contienen cantidades específicas del lote de anticuerpos anti-MAG. Consulte la hoja de datos de control adicional para las concentraciones exactas.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

| Reactivos Sellado / Sin Abrir | |
|--|---|
| Todos los componentes del kit sellados/sin abrir permanecen estables a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. | |
| Reactivos Abiertos / Reconstituidos | |
| Microplaca | Guarde inmediatamente las tiras que no ha utilizado en la bolsa metalizada que contiene los sacos desecantes y vuelva a cerrarla completamente por toda la cremallera. Almacénese hasta 2 meses a 2-8 °C. |
| Tampón de lavado diluido | Almacénese hasta 2 meses a 2-8 °C. |
| Calibradores | Almacénese hasta 2 meses a -20 °C. |
| Controles | |
| Tampón de incubación | Almacénese a entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. |
| Marcador enzimático IgM | |
| Sustrato de TMB | |
| Solución de parada | Almacénese a entre 18 y 28 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. |

Tabla 2

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables: pipetas de 20 µL, 100 µL y 1000 µL.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro de 1000 mL para la dilución del tampón de lavado concentrado.
- Frasco lavador para el tampón de lavado o lavador de placas de microtitulación automático.
- Papel secante.
- Agitador orbital para placas de microtitulación.

- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

PRECAUCIONES

Precauciones de seguridad

- La microplaca (B-MAG-MP), los calibradores (B-MAG-CASET) y los controles (B-MAG-CONSET) de este kit contienen componentes de origen humano. Aunque se ha comprobado y encontrado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, tomando las precauciones adecuadas.
- Solución de parada: La solución de parada (B-STP) contiene ácido sulfúrico (0,25 M). El reactivo es irritante para los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evitar el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Tras un contacto con los ojos o la piel, lavar inmediatamente con abundante agua.
- Reactivos: Evitar el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con cantidades generosas de agua; de lo contrario, se pueden producir irritación o quemaduras.
- Las soluciones/reactivos no utilizados deben eliminarse según la normativa local.

Precauciones técnicas

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Residuos pueden formarse en los pocillos durante el proceso de la producción. Ellos están eliminados completamente durante el lavado de los pocillos y no tienen ninguna influencia en los resultados (véase a punto 3 de la instrucción de uso).
- Prepare los reactivos antes de iniciar el procedimiento de ensayo. Los reactivos empleados en los pasos nº 3 a 9 deben estar fríos (entre 2 y 8 °C) y mantenerse fríos durante el pipeteo y el lavado. Ponga el sustrato de TMB a temperatura ambiente (entre 18 y 28 °C).
- Pasos 3 a 9: Utilice reactivos fríos (entre 2 y 8 °C) en todos estos pasos y manténgalos fríos durante el pipeteo. Recomendación: Prepare el tampón de lavado la tarde anterior a la realización del ensayo y déjelo en el frigorífico hasta el día siguiente.
- Pasos de lavado nº 3, 6 y 9: Los pasos de lavado son cruciales para retirar los residuos presentes en los pocillos de la placa de microtitulación como resultado del proceso de producción (paso nº 3) así como cualquier anticuerpo no unido (pasos nº 6 y 9).
 - Realice siempre los pasos de lavado con tampón de lavado frío (entre 2 y 8 °C).
 - Cerciórese de vaciar los pocillos totalmente después del último ciclo de lavado.
- Paso 10: Cerciórese de utilizar el sustrato de TMB que fue equilibrado a la temperatura ambiente (18-28 °C).

- Paso 11: Agite las placas de microtitulación bien durante la incubación con el sustrato. Las RPM dadas (400-600) no solicitan cada rotor. La solución debe moverse en pocillos – evite salpicaduras.
- BÜHLMANN utilice una lavadora de placa automatizada, programada en "modo supuesto de placa" es decir que cada paso de proceso (dispense) se realiza en todas las tiras secuencialmente, antes de procesar al paso siguiente (aspiración).
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- Debe hacerse todo lo posible para garantizar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos, muestras o entre pocillos.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- El procedimiento requiere <0,1 mL de sangre o <50 µL de suero.
- Muestras lipémicas, hemolíticas o ictericas pueden interferir con el ensayo y no deben ser utilizadas. Se puede evitar la obtención de muestras lipémicas pidiendo a los pacientes que ayunen durante como mínimo las 12 horas previas a la extracción de la muestra.
- Recoja la sangre en tubos limpios (sin anticoagulante), evite la hemólisis, deje coagular durante una hora a temperatura ambiente (18-28 °C), centrifugue durante 10-30 minutos a aproximadamente 1000-2000 x g a temperatura ambiente y recoja el suero.
- Almacene las muestras de suero a ≤-20 °C. Las muestras son estables durante ≥1 año si se almacenan a ≤-20 °C. Evite ciclos repetidos de congelación-descongelación. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente por agitación o inversión suave antes de su uso.
- Recomendamos congelar alícuotas de las muestras de pacientes a fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Diluya todas las muestras de pacientes a estudiar en proporción 1:1000 con tampón de incubación. Utilice 2 µL de suero + 2000 µL de tampón de incubación. Mezcle bien mediante vórtex y deje las muestras diluidas durante una hora a entre 18 y 28 °C. Ponga tanto las muestras como los controles y calibradores reconstituidos durante 10 minutos en hielo antes de proceder al pipeteo en el paso nº 4.
2. Prepare un soporte de placa con el número de tiras necesario para ensayar los calibradores, los controles y las muestras de pacientes. Vuelva a sellar inmediatamente las tiras restantes dentro de la bolsa metalizada junto con los paquetes de desecante. Consérvelas refrigeradas.

Nota: Utilice reactivos fríos en los pasos nº 3 a 9.

3. Lave los pocillos recubiertos cuatro veces utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado ¡frío! por pocillo. Vacíe los pocillos y golpee firmemente la placa sobre papel secante para eliminar completamente el líquido restante.
 - 4a. Pipetee 100 µL de tampón de incubación (como blanco) por duplicado en los pocillos A1+A2.
 Pipetee 100 µL de estándar A por duplicado en los pocillos B1+B2.
 Pipetee 100 µL de estándar B por duplicado en los pocillos C1+C2.
 Pipetee 100 µL de estándar C por duplicado en los pocillos D1+D2.
 Pipetee 100 µL de estándar D por duplicado en los pocillos E1+E2.
 - 4b. Pipetee 100 µL del control bajo por duplicado en los pocillos F1+F2.
 Pipetee 100 µL del control alto por duplicado en los pocillos G1+G2.
 - 4c. Pipetee 100 µL de cada muestra diluida en los pocillos subsiguientes.
 5. Cubra la placa con un sellador de placa e incube durante 2 horas (±5 min) a 2-8 °C.
 6. Retire el sellador de placas. Vacíe los pocillos y lávelos cuatro veces utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado frío (entre 2 y 8 °C) por pocillo. Vacíe los pocillos y golpee firmemente la placa sobre papel secante para eliminar completamente el tampón de lavado.
 7. Añada 100 µL de marcador enzimático IgM a todos los pocillos.
 8. Cubra la placa con un sellador de placa e incube durante 2 horas (±5 min) a 2-8 °C.
 9. Retire el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos cuatro veces utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado en frío (2-8 °C) por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
- Nota: Ajuste la solución sustrato de TMB a temperatura ambiente (entre 18 y 28 °C).*
10. Añada 100 µL de la solución sustrato de TMB a cada pocillo.
 11. Cubra la placa con un sellador de placas e incúbela en un agitador de placas orbital a entre 400 y 600 rpm durante 30 ± 2 minutos a entre 18 y 28 °C. Proteja la placa de la luz directa.
 12. Añada 100 µL de solución de parada a todos los pocillos. Proceda con el paso nº 13 antes de pasados 30 minutos.
 13. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

CONTROL DE CALIDAD

Para obtener resultados fiables se requiere una comprensión adecuada de estas instrucciones de uso. Solo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (según las directrices de BPL vigentes) y siguiendo de manera exacta las instrucciones de uso.

Puesto que no existe ningún suero de control de anticuerpos anti-MAG disponible comercialmente, recomendamos utilizar una combinación de suero positivo y negativo con fines de control de calidad interno.

Todos los controles deben estar dentro de los intervalos de confianza establecidos (BTU). Los intervalos de confianza de los controles son específicos del lote y aparecen impresos en la ficha de datos de CC que se suministra con este kit.

Las características del rendimiento deben estar dentro de los límites establecidos. Si esas características no son conformes con los límites establecidos y la repetición del ensayo permite excluir errores de manipulación, compruebe las posibles fuentes de problemas siguientes: i) ¿se han mantenido a entre 2 y 8 °C todos los reactivos utilizados en los pasos nº 3 a 10?, ii) exactitud de las pipetas, los termómetros y los cronómetros, iii) parámetros del lavador y el lector de ELISA, iv) fecha de caducidad de los reactivos, v) condiciones de conservación e incubación, vi) color de la solución sustrato de TMB (debe ser incolora), vii) pureza del agua.

ESTANDARIZACIÓN

Los calibradores del kit están estandarizados frente a una reserva de referencia interna. La reserva de referencia consiste en más de diez sueros humanos que contienen titulaciones bajas, medias y altas de anticuerpos anti-MAG, respectivamente. Las titulaciones y la especificidad de cada suero en la reserva de referencia se analizaron en primer lugar con técnicas de inmunotransferencia anti-MAG.

Las unidades de titulación BÜHLMANN (BTU) se establecieron como se indica a continuación:

- Se analizaron las muestras de donantes normales según el procedimiento de ensayo ELISA de Autoanticuerpos anti-MAG.
- Se ensayaron muestras diluidas en serie de la reserva de referencia en la misma prueba.
- La dilución en la que la muestra de la reserva de referencia no alcanza el corte corresponde a la titulación de la reserva de referencia.

NOTA: Los valores de titulación del suero dependen del método de ensayo y, en particular, de la especificidad y de los valores de corte establecidos con un método de ensayo individual. Por lo tanto, los valores de titulación obtenidos con diferentes métodos no pueden compararse directamente.

RESULTADOS

Curva estándar

Registre la absorbancia a 450 nm de cada pocillo para trazar una curva de calibración a partir de los promedios de los valores por duplicado de cada calibrador sustrayendo el promedio de DO del blanco. Se recomienda utilizar un programa de software para calcular la curva de calibración y determinar la concentración de las muestras utilizando un ajuste logístico de 4 parámetros (4PL).

Muestras y controles

- Registre la absorbancia a 450 nm de cada pocillo de muestra y control. Substraiga el promedio de DO del blanco del promedio de los valores por duplicado correspondientes a cada muestra y control.
- Localice los valores de absorbancia de las muestras y de los controles en el eje vertical, dibuje una línea horizontal que corte la curva estándar y lea en el eje horizontal.

Si el lector de placas de microtitulación no es capaz de leer una absorbancia mayor de 2 o mayor que la absorbancia del estándar más alto (estándar A), se recomienda una segunda lectura a una longitud de onda de 490 ó 492 nm (filtro de referencia a 600 ó 620 nm si está disponible). En este caso, construya una segunda curva estándar con las lecturas de absorbancia de todos los Calibradores a 490 ó 492 nm. Las concentraciones de las muestras fuera de escala a 450 nm se leen entonces con la nueva curva estándar tal como se ha descrito anteriormente. Las lecturas a 490 ó 492 nm no deben reemplazar las lecturas dentro de la escala a 450 nm.

Nota: Los resultados que se presentan en la tabla 3 y en la figura 1 son ejemplos. Es preciso utilizar el calibrador y los controles en cada ensayo individual.

Los resultados y la curva de calibración se ofrecen únicamente con fines de demostración. Debe generarse una curva de calibración para cada conjunto de muestras que se vaya a ensayar.

LIMITACIONES

1. Los resultados de la prueba se deben interpretar conjuntamente con la información disponible de la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos diagnósticos.
2. La prueba anti-MAG Autoantibodies ELISA no ha sido validada para muestras de plasmaféresis.

INTERVALOS DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE

Se determinó la frecuencia de auto-anticuerpos anti-MAG en sueros humanos normales utilizando muestras de sangre de donantes de sangre voluntarios asintomáticos (hombres y mujeres adultos entre 18 y 70 años de edad). Se ensayaron 150 muestras según el procedimiento del ensayo y se obtuvieron los resultados listados en tabla 4.

NOTA: Estos rangos de titulación deben utilizarse únicamente como orientativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos esperados para su población de pacientes.

Titulación de corte propuesta

La media +3DE produce un valor de corte técnico de 729 BTU. Por razones prácticas recomendamos el uso de un valor de corte de 1000 BTU, que corresponde al estándar más bajo (= estándar D) en la curva estándar.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Precisión Intra-Ensayo (Dentro de la Prueba): 6,5 %. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores obtenidos en una única prueba (tabla 5).

Precisión Inter-Ensayo (Prueba a Prueba): 15,4 %. La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores obtenidos en 20 pruebas diferentes (tabla 6).

Sensibilidad Analítica (LoB): 444 BTU. Se ensayaron 20 pruebas de tampón de incubación en un único curso. El promedio y (también) la desviación de estándar (SD) se calcularon de los valores de absorbancia. La dosis mínima detectable de anticuerpos anti-MAG se calculó en 444 BTU añadiendo dos desviaciones estándar a la absorbancia media y obteniendo la intersección de ese valor con la curva estándar obtenida en el ensayo.

Sensibilidad Funcional (LoQ): 900 BTU. 20 duplicados de titulaciones bajas de auto-anticuerpos anti-MAG se probaron en un único curso. La media, la desviación de estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) se calcularon de los valores de absorbancia. La titulación obtenida es 900 BTU con un coeficiente de variación de 10 %.

Linealidad/Paralelismo de Dilución: 147 %. Se han diluido siete muestras de suero humano ricos de anti-MAG anticuerpos con tampón de incubación de 1:1000 a 1:64000. Las pruebas diluidas han sido a 18-28 °C y han sido examinados por el procedimiento del ensayo (tabla 7). La desviación relativamente alta en 50 % de sueros resulta de agregados de anticuerpos. Por lo general la titulación de los sueros patológicos es elevada. Por eso la titulación no perjudica la discriminación entre pruebas positivas y negativas.

Especificidad: Se realizaron cuatro tipos de experimentos para evaluar la especificidad del ELISA de Autoanticuerpos anti-MAG:

1. Neutralización de auto-anticuerpos anti-MAG: Cinco sueros con titulaciones anti-MAG altas podría inhibirse de la unión a las placas de microtitulación recubiertas con MAG de manera dependiente de la concentración cuando se preincubaban durante una hora con tampón de incubación con un suplemento de 1 a 200 µg/mL de MAG antes de probarlos en el ELISA.

2. Especificidad de la unión de auto-anticuerpos anti-MAG: Cinco sueros con titulaciones medias a muy altas de auto-anticuerpos anti-MAG y cinco sueros negativos se probaron en placas recubiertas con GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b y GQ1b. Ninguna de las muestras mostró un proporción superior a 10 %. Del mismo modo una serie de sueros de enfermedades neurológicas (titulaciones anti-MAG altas) y negativas a auto-anticuerpos antigangliosidos se probaron en placas recubiertas con anti-MAG. Ninguno de los sueros de estas enfermedades produjo una señal superior a 300 BTU.

3. Comparación con inmunotransferencia (Western Blot): Los sueros de 127 pacientes (40 mujeres; 87 hombres; edad 4-90 años) con enfermedades neurológicas causadas presuntamente por auto-anticuerpos anti-MAG se probaron con el método ELISA y un método "western blot", respectivamente. Se utilizó MAG aislado de sistema nervioso central (SNC) humano en los dos métodos. Los doce sueros que mostraban titulaciones medias a muy altas de auto-anticuerpos IgM anti-MAG en el procedimiento ELISA también fueron claramente positivos cuando se analizaron por inmunotransferencia. 114 de los 115 sueros que mostraban titulaciones de anticuerpos anti-MAG por debajo del valor de corte del

ELISA también fueron negativos cuando se analizaron con inmunotransferencia, mientras que un suero fue ligeramente positivo por el método de inmunotransferencia únicamente (F. Ferracin and A.J. Steck, resultados no publicados).

4. Comparación con el ensayo indirecto de inmunofluorescencia (IFA): Los sueros de 150 pacientes (sexo y edad desconocidos) diagnosticados de gammopatías monoclonales IgM se probaron respectivamente con el método ELISA y con un método IFA. En el método IFA los sueros se incubaron en secciones del nervio ciático de mono congeladas y fijadas con acetona y la unión de anticuerpos anti-MAG se detectó con anticuerpos anti-IgM humana marcados con FITC. 26 pacientes (17,3 %) fueron positivos y 115 pacientes (76,7 %) fueron negativos en los dos métodos, mientras que cinco sueros (3,3 %) fueron positivos solamente con el método IFA y cuatro sueros (2,7 %) fueron positivos sólo con el método ELISA, respectivamente (2).

USO PRETENDIDO

O anti-MAG Autoantibodies ELISA é indicado para a determinação quantitativa para diagnóstico *in vitro* dos auto-anticorpos IgM humanos dirigidos contra a glicoproteína associada à mielina (MAG) no soro. O teste serve como auxiliar na monitorização da neuropatia desmielinizante paraproteinêmica (NDP), em conjunto com outros resultados clínicos e laboratoriais (1-7).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O anti-MAG Autoantibodies ELISA emprega uma técnica quantitativa enzimaticamente amplificada de imunoenensaio do tipo sanduíche. As placas de microtitulação do teste são pré-revestidas com MAG altamente purificada do cérebro humano (1). O calibrador, os controles e os soros dos pacientes são incubados nos poços de microtitulação e os auto-anticorpos anti-MAG presentes nas amostras ligam-se à MAG humana imobilizada. Depois da lavagem para remoção das substâncias não ligadas, os auto-anticorpos anti-MAG são detectados com anticorpos marcados com peroxidase de raiz-forte (HRP) contra o IgM humano. Após uma segunda etapa de lavagem, na qual o marcador enzimático não fixado é removido, uma solução de substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) é adicionada. Surge então uma coloração azul proporcional à quantidade de auto-anticorpos ligados à MAG humana imobilizada. O desenvolvimento da cor é interrompido adicionando-se uma solução de parada ácida (ácido sulfúrico diluído), que muda a cor da solução de azul para amarelo. A intensidade da cor é medida em 450 nm.

A absorbância medida é proporcional ao título dos auto-anticorpos anti-MAG humana presentes em uma determinada amostra. Um conjunto de calibradores para auto-anticorpos anti-MAG humana é usado para plotar uma curva de calibração de absorbância vs. unidades de título dos auto-anticorpos anti-MAG humana. Essa curva então pode ser usada para calcular concentrações de auto-anticorpos anti-MAG humana nas amostras.

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

| Reagentes | Quantidade | Código | Reconstituição |
|---|----------------------------------|-------------|---------------------------------------|
| Placa de microtitulação 96 poços pré-revestidos com MAG humana. | 12 tiras x 8poços com suporte | B-MAG-MP | Pronta para utilização |
| Selador da placa | 3 unidades | | |
| Concentrado do tampão de lavagem (10x) | 1 frasco 100 mL | B-MAG-WB | Diluir com 900 mL de água deionizada. |
| Tampão de incubação Com conservantes | 1 frasco 100 mL | B-MAG-IB | Pronto para utilização |
| Calibradores A a D¹ Soro humano com conservantes | 4 frascos | B-MAG-CASET | Adicionar 1 mL de tampão de incubação |

| Reagentes | Quantidade | Código | Reconstituição |
|---|-------------------|--------------|---|
| Controles alto e baixo² Soro humano com conservantes | 2 frascos | B-MAG-CONSET | Adicionar 1 mL de tampão de incubação |
| Marcador enzimático IgM Anticorpo anti-IgM humano conjugado à HRP em um tampão à base de proteína com conservantes. | 1 frasco 11 mL | B-MAG-ELM | Pronto para utilização Solução azul |
| Substrato de TMB TMB em tampão de citrato | 1 frasco 11 mL | B-TMB | Pronta para utilização |
| Solução de parada Ácido sulfúrico 0,25 M | 1 frasco 11 mL | B-STTS | Pronta para utilização Agente corrosivo |

Tabela 1

¹ Depois da reconstituição, os calibradores A, B, C e D contêm 70.000, 15.000, 3.000 e 1.000 Unidades de Título BÜHLMANN (BÜHLMANN Titer Units, ou BTU) de anticorpos anti-MAG, respectivamente.

² Os controles contêm quantidades de anticorpos anti-MAG específicas ao lote. Consulte a folha de dados de CQ adicional para obter as concentrações exatas.

ARMAZENAMENTO E VIDA ÚTIL DOS REAGENTES

| Reagentes Selados / Não Abertos | |
|--|--|
| Todos os componentes de kits selados/não abertos são estáveis na faixa de temperatura de 2-8 °C até a data de validade impressa nos rótulos. | |
| Reagentes Abertos / Reconstituídos | |
| Placa de microtitulação | Retorne imediatamente as tiras não usadas para a embalagem aluminizada contendo os sachês de dessecante e torne a selar ao longo de toda a borda do fecho tipo zip. Guarde por até 2 meses a uma temperatura na faixa de 2-8 °C. |
| Tampão de lavagem diluído | Guarde por até 2 meses a uma temperatura na faixa de 2-8 °C. |
| Calibradores | Guarde por até 2 meses a uma temperatura de -20 °C. |
| Controles | |
| Tampão de incubação | Guarde a uma temperatura na faixa de 2-8 °C até a data de validade impressa nos rótulos. |
| Marcador enzimático IgM | |
| Substrato de TMB | |
| Solução de parada | Guarde a uma temperatura na faixa de 18-28 °C até a data de validade impressa nos rótulos. |

Tabela 2

MATERIAIS NECESSÁRIOS, PORÉM NÃO FORNECIDOS

- Pipetas de precisão com ponteiros descartáveis: pipetas de 20 µL, 100 µL e 1000 µL.
- Tubos descartáveis de poliestireno ou polipropileno para a preparação de diluições de amostras.
- Cilindro de 1000 mL para a diluição do tampão de lavagem.
- Pisseta para o tampão de lavagem ou lavador automático para a placa de microtitulação.

- Papel mata-borrão.
- Agitador orbital para placas de microtitulação.
- Leitora de placa de microtitulação para medição da absorbância a 450 nm.

PRECAUÇÕES

Precauções de segurança

- A placa de microtitulação (B-MAG-MP), os calibradores (B-MAG-CASET) e os controles (B-MAG-CONSET) deste kit contêm componentes de origem humana. Embora testados negativos para o antígeno de superfície do HBV, anticorpos HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manuseados como se fossem capazes de transmitir infecções, sempre de acordo com boas práticas laboratoriais e usando-se as precauções apropriadas.
- Solução de parada: A solução de parada (B-ST5) contém ácido sulfúrico (0,25 M). Esse composto é um irritante dos olhos, pele e membranas mucosas. Evite o contato com os olhos, a pele ou a roupa. Após o contato com os olhos ou a pele, lave imediatamente com água em abundância.
- Reagentes: Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente com quantidades abundantes de água, caso contrário, irritação/queimaduras poderão ocorrer.
- A solução não usada deve ser descartada de acordo com as regulamentações locais, estaduais ou federais.

Precauções técnicas

- Leia atentamente as instruções antes de executar o teste. O desempenho dos testes será afetado negativamente se os reagentes forem diluídos incorretamente, modificados ou armazenados em condições diferentes daquelas detalhadas nesta instrução de uso.
- Os resíduos nos poços da placa de microtitulação resultam do processo de produção. Eles são removidos na etapa de lavagem (etapa 3 do procedimento do ensaio) e não afetam os resultados.
- Prepare os reagentes antes de iniciar o procedimento de teste. Os reagentes utilizados nas etapas 3-9 devem estar frios (2-8 °C) e devem ser mantidos frios durante a pipetagem e lavagem. Deixe que o substrato de TMB atinja a temperatura ambiente (18-28 °C).
- Etapas 3-9: Utilize reagentes frios (2-8 °C) em todas estas etapas e mantenha-os frios durante a pipetagem. Recomendação: Prepare o tampão de lavagem no fim do dia anterior à execução do ensaio e deixe-o no refrigerador a noite toda.
- Etapas de lavagem 3, 6 e 9: As etapas de lavagem são fundamentais para a remoção de resíduos dos poços da placa de microtitulação gerados pelo processo de produção (etapa 3), assim como todos os anticorpos não ligados (etapas 6 e 9).
 - As etapas de lavagem devem ser sempre realizadas com o tampão de lavagem frio (2-8 °C).
 - Certifique-se de que todos os poços estejam completamente vazios depois do último ciclo de lavagem.

- Etapa 10: Deixe que o substrato de TMB atinja a temperatura ambiente (18-28 °C) antes de usá-lo.
- Etapa 11: Agite as placas de microtitulação durante a incubação com o substrato. Dependendo do agitador de placas, recomendamos 400-600 rpm. A solução deve se movimentar nos poços, mas sem transbordar nem derramar.
- Se uma lavadora automática for utilizada, o “modo de placa” deve ser selecionado para que a dispensação seja executada sequencialmente em todas as tiras antes da aspiração.
- Os componentes não devem ser usados depois da data de validade impressa nos rótulos.
- Não misture lotes diferentes de reagentes.
- Todas as providências devem ser tomadas para assegurar que não ocorra contaminação cruzada entre os reagentes, amostras ou entre poços.
- Os micropoços não podem ser reutilizados.

COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

- O procedimento requer <0,1 mL de sangue ou <50 µL de soro.
- Amostras lipêmicas, hemolíticas ou ictericas não devem ser usadas neste ensaio. As amostras lipêmicas podem ser evitadas pedindo-se aos pacientes que jejem por pelo menos 12 horas antes da coleta da amostra.
- Colete o sangue em tubos comuns (sem anticoagulante), evite a hemólise, deixe em repouso para coagular por uma hora à temperatura ambiente (18-28 °C), centrifugue por 10-30 minutos a 1.000-2.000 g e colete o soro.
- Armazene as amostras de soro a ≤-20 °C. As amostras permanecem estáveis por mais de 1 ano se mantidas a ≤-20 °C. Evite ciclos repetidos de congelamento-descongelamento. As amostras congeladas devem ser descongeladas e bem misturadas por meio de inversão ou movimentos circulares suaves antes da utilização.
- Recomendamos congelar alíquotas de amostras de pacientes para evitar descongelar/congelar o material repetidas vezes.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1. Dilua todas as amostras de pacientes a serem investigadas na proporção de 1:1000 com o tampão de incubação. Use 2 µL de soro + 2000 µL de tampão de incubação. Misture bem em um agitador vórtex e deixe as amostras diluídas em repouso por uma hora a 18-28 °C. Coloque as amostras, bem como os calibradores e os controles reconstituídos, por 10 minutos no gelo antes de pipetar na etapa 4.
2. Prepare uma placa com a quantidade necessária de tiras para testar os calibradores, controles e as amostras dos pacientes. Sele as tiras remanescentes imediatamente na embalagem aluminizada, juntamente com os sachês de dessecante. Mantenha sob refrigeração.

Nota: use reagentes frios nas etapas 3 a 9.

3. Lave os poços revestidos quatro vezes, usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio! por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão para remover completamente todo o líquido remanescente.
- 4a. Pipete 100 µL do tampão de incubação (branco) em duplicata nos poços A1+A2.
Pipete 100 µL do calibrador A em duplicata nos poços B1+B2.
Pipete 100 µL do calibrador B em duplicata nos poços C1+C2.
Pipete 100 µL do calibrador C em duplicata nos poços D1+D2.
Pipete 100 µL do calibrador D em duplicata nos poços E1+E2.
- 4b. Pipete 100 µL do controle baixo em duplicata nos poços F1+F2.
Pipete 100 µL do controle alto em duplicata nos poços G1+G2.
- 4c. Pipete 100 µL de cada amostra diluída em duplicata nos poços subsequentes.
5. Cubra a placa com um selador e incube por 2 horas (±5 minutos) a 2-8 °C.
6. Remova o selador da placa. Esvazie os poços e lave quatro vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio (2-8 °C) por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão para remover o tampão de lavagem completamente.
7. Adicione 100 µL do marcador enzimático IgM a todos os poços.
8. Cubra a placa com um selador e incube por 2 horas (±5 minutos) a 2-8 °C.
9. Remova o selador da placa. Esvazie os poços e lave quatro vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio (2-8 °C) por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão.

Nota: Deixe que o substrato de TMB atinja a temperatura ambiente (18-28 °C).

10. Adicione 100 µL da solução do substrato de TMB a cada poço.
11. Cubra a placa com um selador e a incube em um agitador orbital a 400-600 rpm por 30 ± 2 minutos a 18-28 °C. Proteja a placa contra a luz direta.
12. Adicione 100 µL da solução de parada em todos os poços. Execute a etapa 13 dentro de até 30 minutos.
13. Leia a absorbância a 450 nm em uma leitora de placa de microtitulação.

CONTROLE DE QUALIDADE

Uma boa compreensão destas instruções de uso é necessária para se obter resultados confiáveis. Esses resultados serão obtidos somente com o emprego de técnicas laboratoriais precisas (diretrizes atuais de Boas Práticas de Laboratório-BPL) e do cumprimento exato das instruções de uso.

Uma vez que não existe soro de controle para anticorpos anti-MAG comercialmente disponíveis, recomendamos o uso de um pool de soros positivos e negativos para controle de qualidade interno.

Todos os controles devem estar dentro dos intervalos de confiança estabelecidos (BTU). Os intervalos de confiança dos controles são específicos a cada lote e estão impressos na folha de dados de CQ fornecida com este kit.

As características de desempenho devem permanecer dentro dos limites estabelecidos. Se essas características não atenderem aos limites estabelecidos e a repetição excluir falhas de manuseio, verifique os seguintes problemas: i) se todos os reagentes usados nas etapas 3-10 foram mantidos a 2-8 °C, ii) a exatidão das pipetas, termômetros e temporizadores, iii) a configuração da lavadora e da leitora do ELISA, iv) a data de validade dos reagentes, v) as condições de armazenamento e incubação, vi) a cor da solução do substrato de TMB (deve ser incolor), e vii) a pureza da água.

PADRONIZAÇÃO

Os calibradores incluídos neste kit foram padronizados com base em um pool de referências internas. Esse pool de referências consiste em mais de dez amostras de soro humano contendo títulos baixos, médios e altos de anticorpos anti-MAG.

Os títulos e a especificidade de cada soro em relação ao pool foram inicialmente analisados por imunoblots anti-MAG.

As Unidades de Título BÜHLMANN (BTU) foram estabelecidas como se segue:

- Amostras de doadores normais foram testadas de acordo com o procedimento de ensaio do anti-MAG Autoantibodies ELISA.
- Amostras do pool de referência diluídas serialmente foram testadas na mesma corrida.
- A diluição em que a amostra do pool de referência não alcançou o valor de corte corresponde ao título do pool de referência.

Nota: Os valores de título de soro dependem do método de ensaio e, em particular, da especificidade e dos valores de corte estabelecidos com um método de teste individual. Assim, valores de título obtidos com diferentes métodos não podem ser comparados diretamente.

RESULTADOS E CÁLCULO

Curva de calibração

Registre a absorbância a 450 nm para cada poço para gerar uma curva de calibração a partir da média das duplicatas dos calibradores, subtraindo a densidade óptica (OD) média dos brancos de cada calibrador. Recomenda-se usar um programa de software para calcular a curva de calibração e determinar a concentração das amostras, usando ajuste por regressão logística de 4 parâmetros (4 PL).

Amostras e controles

- Registre a absorbância a 450 nm para cada amostra e poço de controle. Subtraia a OD média dos brancos da média dos valores das duplicatas de cada amostra e controle.
- Localize os valores de absorbância das amostras e controles no eixo vertical, trace uma linha horizontal até a intersecção com a curva de calibração e leia o valor resultante no eixo horizontal.

Se a leitora da placa de microtitulação não conseguir ler uma absorbância maior que 2 ou maior que a absorbância do maior calibrador (calibrador A), recomenda-se uma segunda leitura em um comprimento de onda de 490 ou 492 nm (filtro de referência a 600 ou 620 nm, se disponível). Neste caso, desenvolva uma segunda curva de calibração com as leituras de absorbância de todos os calibradores a 490 ou 492 nm. A concentração das amostras fora da escala a 450 nm é então lida conforme descrito acima na nova curva de calibração. As leituras a 490 ou 492 nm não devem substituir as leituras em escala a 450 nm.

Nota: Os resultados apresentados na tabela 3 e na figura 1 são exemplos. O calibrador e os controles devem ser utilizados em cada ensaio individual.

Os resultados e a curva de calibração são fornecidos somente para fins de demonstração. Uma curva de calibração deve ser gerada para cada conjunto de amostras a ser analisado.

LIMITAÇÕES

1. Os resultados dos testes devem ser interpretados em conjunto com as informações disponíveis da avaliação clínica do paciente e de outros procedimentos de diagnóstico.
2. O anti-MAG Autoantibodies ELISA ainda não foi validado para amostras de plasmáfereze.

INTERVALOS DE REFERÊNCIA E VALORES DE CORTE

A frequência dos auto-anticorpos anti-MAG no soro humano normal foi determinada usando-se amostras de sangue de doadores assintomáticos voluntários (mulheres e homens adultos com idade entre 18 e 70 anos). 150 amostras foram analisadas de acordo com o procedimento do ensaio e os resultados listados na tabela 4 foram obtidos.

Nota: Estas faixas de título devem ser usadas apenas como diretrizes. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça suas próprias faixas esperadas para suas populações de pacientes.

Título de corte proposto

A média +3 DP resulta em um valor técnico de corte de 729 BTU. Por motivos práticos, recomendamos o uso de um valor de corte de 1000 BTU, correspondente ao calibrador mais baixo (calibrador D) da curva padrão.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Precisão intraensaio: 6,5 %. A precisão intraensaio foi calculada a partir dos resultados de 20 pares de valores obtidos em uma única corrida (tabela 5).

Precisão interensaios: 15,4 % A precisão interensaios foi calculada a partir dos resultados de 20 pares de valores obtidos em 20 corridas diferentes (tabela 6).

Limite do branco (LoB): 444 BTU. 20 duplicatas do tampão de incubação foram analisadas em uma única corrida. A média e o desvio padrão foram calculados para os valores de absorbância. A dose mínima detectável de anticorpos anti-MAG foi calculada como 444 BTU através da adição de dois desvios padrão à absorbância média,

seguida da intersecção desse valor na curva padrão obtida para esta corrida.

Limite de quantificação (LoQ): 900 BTU. 20 duplicatas de auto-anticorpos anti-MAG de título baixo foram analisadas em uma única corrida. A média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) foram calculados para os valores de absorbância. Um título de 900 BTU foi encontrado, com um CV menor do que 10 %.

Linearidade/ paralelismo da diluição: 147 % 7 amostras de soro humano contendo títulos altos de anticorpos anti-MAG foram diluídas com tampão de incubação entre 1:1000 e 1:64.000, deixadas em repouso por uma hora a 18-28 °C e então submetidas ao ensaio de acordo com o procedimento de teste (tabela 7). Sugere-se que o desvio relativamente alto em cerca de 50 % das amostras se deva a agregações de anticorpos. De modo geral, soros patológicos mostram títulos bastante elevados de auto-anticorpos e, portanto, não têm influência na discriminação positivo/negativo.

Especificidade: Quatro conjuntos de experimentos foram realizados para avaliar a especificidade do anti-MAG Autoantibodies ELISA:

1. Neutralização de auto-anticorpos anti-MAG: Cinco amostras de soro com títulos elevados de anti-MAG foram inibidos para não se ligarem às placas de microtitulação revestidas com MAG de maneira dependente da concentração, quando pré-incubados por 1 hora com um tampão de incubação suplementado por 1 a 200 µg/mL de MAG antes do teste no ELISA.

2. Especificidade da ligação dos auto-anticorpos anti-MAG: Cinco amostras de soro com títulos médios a altos de auto-anticorpos anti-MAG e cinco amostras negativas de soro foram testadas na placa GanglioCombi (EK-GCO) revestida com GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b e GQ1b. Nenhuma das amostras apresentou uma razão percentual superior a 10 %. Similarmente, seis amostras de soro com títulos altos de auto-anticorpos antigangliosídeos (ver acima) e cinco amostras de soro negativas foram testadas em placas cobertas com MAG. Nenhum destes soros de estado de doença sinalizou um valor superior a 300 BTU.

3. Comparação com imunoblots (Western Blot): 127 soros de pacientes (40 mulheres e 87 homens com idade entre 4 e 90 anos) com doenças neurológicas suspeitamente causadas por auto-anticorpos anti-MAG foram testados com o ELISA e com um método Western Blot. MAG isolada do sistema nervoso central (SNC) humano foi usada em ambos os métodos. Todas as doze amostras de soro com títulos com variação de médio a muito alto dos auto-anticorpos anti-MAG IgM no procedimento do ELISA também se mostraram claramente positivas quando analisadas com imunoblots. Das 115 amostras de soro com títulos de anticorpos anti-MAG IgM abaixo do valor de corte do ELISA, 114 também se mostraram negativas quando analisadas com imunoblots, enquanto uma amostra de soro resultou ligeiramente positiva com o método do imunoblot, apenas (F. Ferracin e A. J. Steck, resultados não publicados).

4. Comparação com ensaio de imunofluorescência indireta (IFD): Amostras de soro de 150 pacientes (sexo e idade desconhecidos) diagnosticados com gamopatias monoclonais do tipo IgM foram testadas pelo ELISA e por um método IFD. No método IFD, o soro foi incubado em seções de nervo ciático de macaco fixado em acetona e congelado, e os anticorpos anti-MAG ligados foram detectados pelo anticorpo anti-IgM humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). 26 pacientes (17,3 %) resultaram positivos e 115 pacientes (76,7 %) resultaram negativos em ambos os métodos, enquanto cinco amostras de soro (3,3 %) resultaram positivas no método IFD, apenas, e quatro (2,7 %) se mostraram positivas apenas no método ELISA (2).

APPENDIX I

TABLES AND FIGURES / TABELLEN UND ABBILDUNGEN / TABLES ET FIGURES / TABELLE E FIGURE / TABLAS Y FIGURAS / TABELAS E FIGURAS

Examples of results

| | Conc. [BTU] | Absorbance [OD] | Calc. Conc. [BTU] | CV Conc. [%] |
|----------------|----------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| Blank 1 | | 0.046 | | |
| Blank 2 | | 0.049 | | |
| Average | | 0.048 | | |
| Calibrator A | 70000 | 2.195 | 70497 | |
| Calibrator A | 70000 | 2.188 | 69508 | |
| Average | 70000 | 2.191 | 70000 | 0.2 |
| Calibrator B | 15000 | 1.272 | 15313 | |
| Calibrator B | 15000 | 1.245 | 14693 | |
| Average | 15000 | 1.258 | 15000 | 1.5 |
| Calibrator C | 3000 | 0.417 | 3070 | |
| Calibrator C | 3000 | 0.400 | 2931 | |
| Average | 3000 | 0.408 | 3000 | 2.9 |
| Calibrator D | 1000 | 0.135 | 1009 | |
| Calibrator D | 1000 | 0.132 | 991 | |
| Average | 1000 | 0.134 | 1000 | 1.5 |
| Control LOW | | 0.360 | 2602 | |
| Control LOW | | 0.376 | 2731 | |
| Average | | 0.368 | 2666 | 3.1 |
| Control HIGH | | 1.395 | 18433 | |
| Control HIGH | | 1.383 | 18090 | |
| Average | | 1.389 | 18261 | 0.6 |
| Sample 1 | | 0.001 | 255 | |
| Sample 1 | | 0.009 | 297 | |
| Average | | 0.005 | 276 | 116.5 |
| Sample 2 | | 1.092 | 11599 | |
| Sample 2 | | 0.969 | 9511 | |
| Average | | 1.030 | 10555 | 8.5 |

Table 3

Example of Standard Curve (OD₄₅₀)

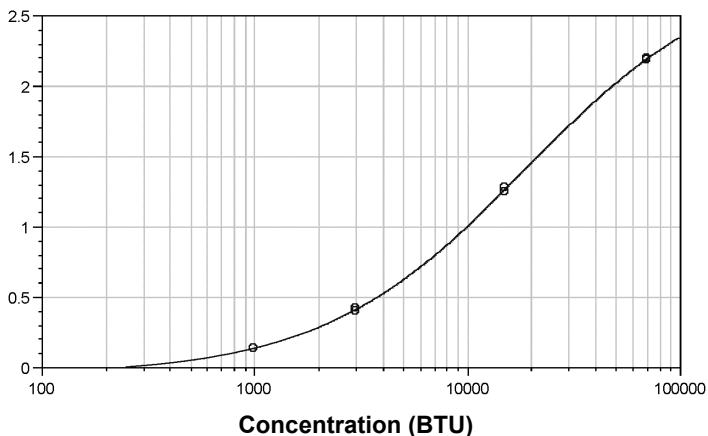


Figure 1

Cut-off values and Standardization

| | |
|-------------------|--------|
| Total (n) | 150 |
| Range (BTU) | 0 -832 |
| Mean Value (BTU) | 173 |
| SD (BTU) | 186 |
| Mean + 3 SD (BTU) | 729 |

Table 4

Intra-Assay Precision (Within-Run)

| Sample Type | Mean [BTU] | SD [BTU] | CV [%] |
|----------------|---------------|-------------|-----------|
| Serum 1 (Low) | 3764 | 176 | 4.7 |
| Serum 2 (High) | 35384 | 2920 | 8.3 |
| Mean | | | 6.5 |

Table 5

Inter-Assay Precision (Run-to-Run)

| Sample Type | Mean [BTU] | SD [BTU] | CV [%] |
|----------------|---------------|-------------|-----------|
| Serum 3 (Low) | 4208 | 714 | 17.0 |
| Serum 4 (High) | 17112 | 2362 | 13.8 |
| Mean | | | 15.4 |

Table 6

Dilution Linearity

| Serum Samples | Range Min-Max | Mean Observed/Expected |
|---------------|------------------|------------------------|
| 5 | 78-96 % | 86 % |
| 6 | 99-119 % | 107 % |
| 7 | 105-151 % | 123 % |
| 8 | 162-229 % | 206 % |
| 9 | 135-231 % | 196 % |
| 10 | 112-292 % | 233 % |
| 11 | 59-98 % | 76 % |
| Mean | | 147 % |

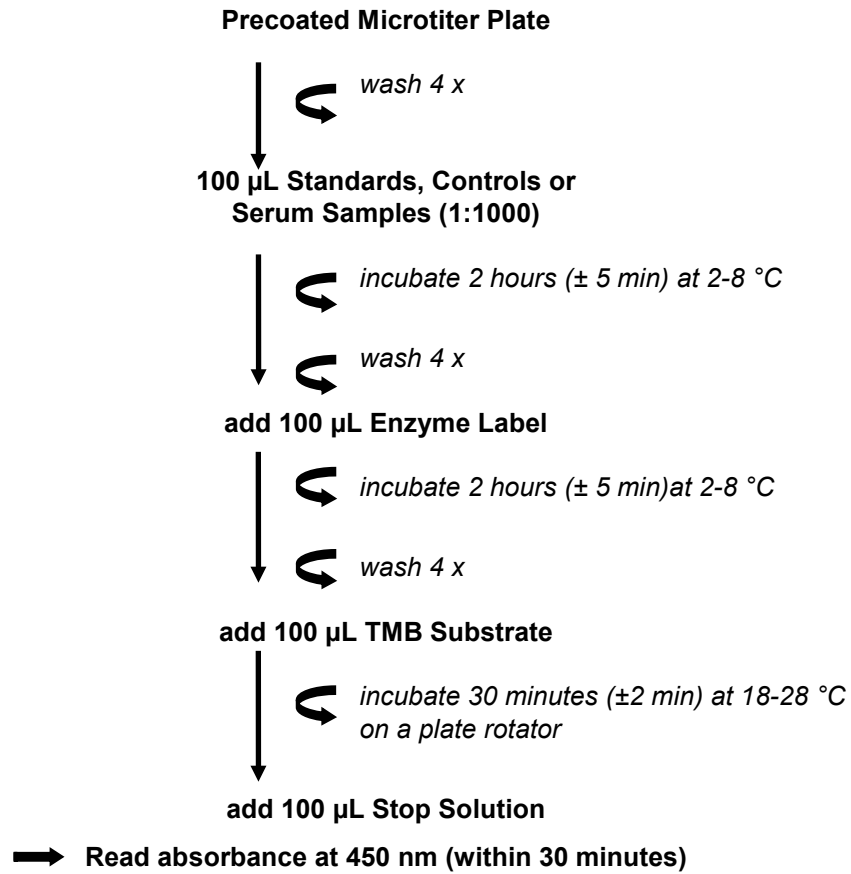
Table 7

APPENDIX II

REFERENCES / LITERATURREFERENZEN / RÉFÉRENCES / RIFERIMENTI / REFERENCIAS/ REFERÊNCIAS

1. Willison, H.J. et al.: Use of antibody testing in nervous system disorders. European Handbook of Neurological Management, Vol 1, 2nd edition, edited by Gilhus N.E. et al., (2011).
2. Bourque, R. P. et al.: Autoimmune peripheral neuropathies. Clin Chim Acta 449, 37-42 (2015).
3. Nobile-Orazio E Update on neuropathies associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance . JPNS 15, 302-306 (2010) .
4. Kuijf M et al.; Detection of anti-MAG antibodies in polyneuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. Neurology 73(9), 688-95 (2009).
5. Hadden R.D.M et al., Paraproteinemic demyelinating neuropathies; European Handbook of Neurological Management: Volume 1, 2nd Edition, © 2011 Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-405-18533-2
6. Pruppers M.H.J. et al., Improving future assessment and Research in IgM anti-MAG peripheral neuropathy: a consensus collaborative effort; Neuromuscular Disorders **27**, 1065-1072, (2017)
7. Dalakas M C.; Advances in the diagnosis immunopathogenesis and therapies of IgM- anti-MAG antibody-mediated neuropathies; Ther Adv Neurol Disord **11**, 1-12 (2018)

anti-MAG Autoantibodies ELISA







TIME TO RESULT: 4.5 HOURS

APPENDIX IV

NOTES / NOTIZEN / NOTES / NOTE / NOTAS

APPENDIX V

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

| Symbol | Explanation | Symbol | Explanation |
|---|---|---------------------|--|
|  | Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad Data de expiração | MP | Microtiter Plate Mikrotiterplatte Microplaque Micropiastra Microplaca Placa de microtitulação |
| REF | Catalogue Number Bestellnummer Référéncie du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo Número de catálogo | BUF WASH 10X | Wash Buffer Concentrate (10x) Waschpuffer Konzentrat (10x) Tampon de lavage concentré (10x) Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (10x) Concentrado do tampão de lavagem (10x) |
| LOT | Batch Code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote Código lote | CALA - CALD | Calibrator A - D Kalibrator A - D Calibreur A - D Calibratore A - D Calibrador A - D Calibrador A - D |
| IVD | <i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Producto sánitarío para diagnóstico <i>in vitro</i> | CONTROL L | Low Control Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo Controle baixo |
|  | Contains Sufficient for <n> Tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos Conteúdo suficiente para <n> tests | CONTROL H | High Control Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto Controle alto |
|  | Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso Leia cuidadosamente as instruções | EL IgM | Enzyme Label IgM Enzymmarker IgM Marqueur enzymatique IgM Marcatore enzimatico IgM Marcador enzimático de IgM Marcador enzimático IgM |
|  | Temperature Limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura Límite de temperatura | SUBS TMB | TMB Substrate TMB Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato TMB Substrato TMB |
| BUF INC | Incubation Buffer Inkubationspuffer Tampon d'incubation Tampone di incubazione Tampón de incubación Tampão de incubação | SOLN STOP | Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada Solução de parada |

