



anti-SGPG

anti-Sulfate-3-Glucuronyl Paragloboside Autoantibodies ELISA

EK-SGPG 96 tests

Revision Date: 2012-11-16

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN anti-SGPG test is intended for the semi-quantitative *in vitro* diagnostic determination of human IgM-autoantibodies directed against sulfate-3-glucuronyl paragloboside [SGPG] and sulfate-3-glucuronyl-lactosaminyl-paragloboside [SGLPG] (1-3).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The anti-SGPG autoantibodies ELISA employs the quantitative enzymatically amplified sandwich-type immunoassay technique. Highly purified SGPG and SGLPG from bovine *cauda equina* have been precoated onto a microtiter plate. The Calibrator, Controls and patient sera are incubated for two hours in the microtiter wells and anti-SGPG autoantibodies present are bound by the immobilized bovine SGPG. After washing away any unbound substances, horseradish peroxidase (HRP) labeled antibodies against human IgM are added to the wells and incubated for another 2 hours. After a washing, the substrate solution containing tetramethylbenzidine (TMB) is added to the wells and incubated for 30 minutes. A blue coloration develops in proportion to the amount of anti-SGPG autoantibodies bound in the initial step. The color development is stopped by addition of the acidic stop solution (H₂SO₄) which turns the blue solution to yellow. The intensity of the color absorbance is measured in a microtiter plate reader at a wavelength of 450 nm. The absorbance measured is directly proportional to the concentration of anti-human SGPG autoantibodies.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Microtiter Plate 96 wells precoated with bovine SGPG	12 x 8-well strips with holder	B-SGPG-MP	Ready to use
Plate Sealer	3 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10x) with preservatives	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
Calibrator ¹⁾ Human serum with preservatives	1 vial	B-SGPG-CA	Add 1 ml of Incubation Buffer
Control Low, Medium and High ²⁾ Human serum with preservatives	3 vials	B-SGPG-CONSET	Add 1 ml of Incubation Buffer
Enzyme Label Anti-IgM-HRP in a protein-based buffer; preservatives	1 vial 11 ml	B-SGPG-ELM	Ready to use Blue solution
TMB Substrate TMB in Citrate buffer with Hydrogen Peroxide	1 vial 11 ml	B-TMB	Ready to use
Stop Solution 0.25 M Sulfuric acid	1 vial 11 ml	B- STS	Ready to use Corrosive agent

Table 1

¹⁾ The Calibrator consists of a diluted positive serum which has been standardized to an internal established reference (see chapter standardization and cut-off).

²⁾ Low, Medium and High Control contain lot-specific amounts of anti-SGPG antibodies. Refer to the QC data sheet provided with the kit for the corresponding ratios.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Store at 2-8°C. Do not use past kit expiration date printed on the label.	
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.
Wash Buffer diluted	Store for up to 2 months at 2-8°C.
Calibrator	Store for up to 2 months at -20°C.
Controls	
Incubation Buffer	Store at 2-8°C until expiration date.
Enzyme Label	
TMB Substrate (protect from light)	
Stop Solution	Store at 18-28°C until expiration date.

Table 2

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- Both, Calibrator (B-SGPG-CA) and Controls (B-SGPG-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.
- Substrate and Stop Solution:** The Substrate Solution (B-TMB) contains Tetramethylbenzidine (TMB), hydrogen peroxide and dimethylformamide. The Stop Solution (B-STs) contains sulfuric acid. Each of those reagents is irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothing. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.
- Unused solution should be disposed of according to local State and Federal regulations.

TECHNICAL PRECAUTIONS

Kit components

- 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.
- Steps 3-9:** Use cold (2-8°C) reagents for all these steps and keep them cold while pipetting.
- Steps 3, 6, 9:** Make sure that the wells are completely empty after the last washing cycle.
- Step 9:** Adjust TMB Substrate to room temperature (18-28°C) before using it.
- Step 11:** Shake microtiter plates during the incubation with substrate. Depending on the plate shaker, we recommend 400-600 rpm. The solution should be moved 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.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes with disposable tips: 2 µl, 100 µl and 1 ml pipettes.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 ml cylinder for the dilution of the Wash Buffer Concentrate.
- Microtiter plate washer or squeeze bottle for Wash Buffer.
- Microtiter plate rotator.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The procedure calls for <0.1 ml of blood or <50 µl of serum. 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, avoid hemolysis, leave to clot for one hour at RT (18-28°C), centrifuge for 10 minutes at approximately 1000 x g at RT and 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.

ASSAY PROCEDURE

Note: use refrigerated reagents in steps 3. to 9.

1. Dilute all patient samples 1:1000 with Incubation Buffer (e.g. 2 µl of serum + 2 ml of Incubation Buffer). Mix thoroughly by vortexing and leave diluted samples for 60 minutes at 18-28°C. Put samples for 10 minutes on ice prior to pipetting in step 4f.
2. Use a plate with enough 8-well strips to test the desired number of blank, calibrator, controls and samples. Remove excess strips from the holder and re-seal them together with the two desiccant bags without delay. Store refrigerated.
3. Wash the coated strips four times using at least 300 µl of wash buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
- 4a. Pipet 100 µl of Incubation Buffer (blank) in duplicate into wells A1+A2.
- 4b. Pipet 100 µl of Calibrator in duplicate into wells B1+B2
- 4c. Pipet 100 µl of Low Control in duplicate into wells C1+C2
- 4d. Pipet 100 µl of Medium Control in duplicate into wells D1+D2
- 4e. Pipet 100 µl of High Control in duplicate into wells E1+E2
- 4f. 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 and discard the plate sealer. Wash the plate four times using at least 300 µl of wash buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
7. Add 100 µl of Enzyme Label (blue solution) to all wells.

8. Cover the plate with a new plate sealer, and incubate for 2 hours (± 5 min) at 2-8°C.
9. Remove and discard the plate sealer. Wash the plate four times using at least 300 µl of wash buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.

Important: Allow the TMB substrate solution to come to 18-28°C prior to using it in step 10.

10. Add 100 µl of TMB substrate solution to all wells.
11. Cover the plate and place the plate on a plate rotator set at 800-1000 rpm, protect the plate from direct light and incubate for 30 minutes (± 5 min) at 18-28°C.
12. Add 100 µl of stop solution to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 13 within 30 minutes.
13. Read the absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.

STANDARDIZATION

The Calibrator included in this kit has been calibrated against internal reference material (diluted positive serum). The dilution was chosen in the range between the OD of normal blood donors and positive sera.

RESULTS AND CALCULATION

Calibrator: Record the absorbance at 450 nm (OD₄₅₀) and subtract the averaged blank value. Average the duplicate values. The Ratio of the calibrator is set to a value of 1 (divided by itself).

Samples and Controls: Record the absorbance at 450 nm (OD₄₅₀) for each sample and control well and subtract the averaged blank value. Average the duplicate values. Calculate the Ratio from the averaged sample absorbance to the averaged absorbance of the Calibrator.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{meannet OD}_{450} \text{ of sample}}{\text{meannet OD}_{450} \text{ of calibrator}}$$

Note: The results presented in Table 11 are examples. Calibrator and Controls must be used in each individual assay.

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this instruction for use (IFU) is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this IFU.

Bühlmann strongly recommends testing Blank, Calibrator, Control and samples in duplicate.

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

All controls must fall within established confidence limits. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the additional data sheet.

The reproducibility of the calibrator and control values should be within established limits of laboratory acceptability. If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) ELISA reader settings iii) expiration dates of reagents iv) storage and incubation conditions v) TMB Substrate Solution should be colorless vi) purity of water.

PERFORMANCE LIMITATIONS

Test results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision (Within-Run): 4.9%. The intra-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values from four human sera obtained in a single run (*cf.* Table 13).

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 10.0%. The inter-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values from 6 human sera obtained in 20 different runs (*cf.* Table 14)

Dilution Linearity/Parallelism: 151%. 13 human serum samples containing high titer of anti-SGPG antibodies were diluted with Incubation Buffer 1:1000 to 1:128'000, left for one hour at 18-28°C and subsequently assayed according to the assay procedure. The ratio O/E (observed/expected) was calculated step by step (*cf.* Table 15). It is suggested that the relatively high deviation particularly at high antibody concentrations in the samples is due to antibody aggregations. In general, pathological sera show strongly elevated titer of autoantibodies therefore it has no influence to the positive/negative discrimination.

Detection limit (LOB): <0.01 Ratio. 20 duplicates of Incubation Buffer were assayed in a single run. Mean and standard deviation (SD) were calculated for the absorbance values (OD). After subtraction of the blank absorbance value and calculation of the ratio a value of 0.006 was obtained.

Detection limit (LOQ): <0.15 Ratio. An anti-SGPG autoantibody positive serum was subsequently diluted (1:1000 – 1:100'000). 20 duplicates of each dilution were assayed in a single run. Mean, standard deviation (SD) and coefficient of variation (%CV) were calculated from the absorbance values. We found a ratio <0.145 with a CV of less than 10% (*cf.* Table 15).

Specificity: Two sets of experiments were performed to assess the specificity of the BÜHLMANN anti-SGPG ELISA:

1. NEUTRALIZATION OF ANTI-SGPG AUTOANTIBODIES: Two sera with high anti-SGPG titers could be increasingly inhibited from binding to the microtiter plates coated with SGPG in concentration-dependent manner when preincubated for 16 hours by 4°C Incubation Buffer supplemented with increasing amount of SGPG (32 ng to 1.6 µg SGPG in Eq/galactose) prior to testing in the ELISA.

2. SPECIFICITY OF ANTI-SGPG AUTOANTIBODY BINDING: Ten sera of medium and high anti-Ganglioside autoantibody titer (asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b) and five negative sera were tested in the anti-SGPG ELISA. 9/10 of these disease state sera and all negative sera resulted in a ratio lower than 0.6. The positively tested sample was further assayed by thin layer chromatography (TLC) for anti-SGPG and anti-GD1a autoantibodies. The existence of both kind of antibodies could be confirmed by TLC.

REFERENCE INTERVALS AND CUT-OFF

Proposed Cut-off Ratio

The Background Ratio of anti-SGPG was determined using 200 blood samples from asymptomatic volunteer blood donors (49 female, 151 male at the age of 18 to 70 years) which were tested according to the assay procedure. Only 1/200 (0.5%) samples showed a Ratio of >1. Six sera showed a Ratio between 0.5 and 0.6, whereas 193/200 (96.5%) sera showed ratio values below 0.5.

14 anti-MAG positive sera were tested. Each serum showed a Ratio of 2.4 or higher. The results are listed in Table 12. Therefore we propose a **cut-off Ratio of 1**.

Additionally, in an external study including 223 sera from patients affected by a suspected neuropathy the above proposed cut-off was verified. 178 sera were tested with the reference method thin layer chromatography (TLC) described in the literature (4). 99/110 positive TLC sera were tested positive in the anti-SGPG ELISA. 66/68 TLC negative sera were tested negative in the ELISA. This results in a calculated sensitivity and specificity of the ELISA of 90.0% and 97.1%, respectively (personal communication Dr. C. Caudie, Lyon, F).

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN anti-SGPG Test wird gebraucht für die semi-quantitative in vitro diagnostische Bestimmung von IgM-Autoantikörper gegen sulfate-3-glucuronyl paragloboside [SGPG] und sulfate-3-glucuronyl lactosaminyl paragloboside [SGLPG] beim Menschen (1-3).

PRINZIP DER METHODE

Der anti-SGPG Autoantikörper ELISA ist ein immunometrischer Festphasen-Enzymimmunoassay. Die Mikrotiterplatte ist mit hochaufgereinigtem SGPG und SGLPG aus boviner *Cauda equina* beschichtet. Der Kalibrator, die Kontrollen und die Patientenserum werden in die Antigenbeschichtete Mikrotiter-Platte pipettiert. In der Probe vorhandene Autoantikörper gegen SGPG binden während der ersten 2-stündigen Inkubation an das immobilisierte SGPG. Nicht gebundene Serumkomponenten werden durch einen Waschschrift entfernt. Anschließend wird ein, gegen die nachzuweisenden Autoantikörper gerichtetes, anti-human-IgM-Meerrettichperoxidase (anti-IgM-HRP) Konjugat in die Mikroküvetten pipettiert. An die immobilisierten Antigene gebundene Autoantikörper werden während der folgenden 2-stündigen Inkubation von diesem enzymmarkierten Tracer-Antikörpern spezifisch erkannt und durch Ausbildung eines Sandwich-Komplexes markiert. Ungebundenes Enzymkonjugat wird durch erneutes Waschen eliminiert. Das zugegebene Substrat, Tetramethylbenzidin (TMB) wird anschließend vom gebundenen Enzym zu einem blauen Endprodukt umgesetzt. Die Enzymreaktion wird nach 30 Minuten durch Zugabe einer sauren Stop-Lösung (H_2SO_4) beendet, welche die Färbung nach gelb umschlagen läßt. Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung ist der Konzentration Autoantikörper in den Proben direkt proportional.

GELIEFERTE REAGENZIIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Mikrotiter-Platte beschichtet mit SGPG (bovin)	12 x 8 Küvetten mit Halter	B-SGPG-MP	gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Stück		
Wasch-Puffer Konzentrat (10x)	1 Flasche 100 ml	B-MAG-WB	mit 900 ml deionisiertem H_2O verdünnen
Inkubations-Puffer mit Konservierungsstoffen	1 Flasche 100 ml	B-MAG-IB	gebrauchsfertig
Kalibrator¹⁾ humanes Serum mit Konservierungsstoffen	1 Flasche	B-SGPG-CA	mit 1 ml Inkubations- Puffer versetzen
Kontrolle tief, medium hoch²⁾ humanes Serum mit Konservierungsstoffen	3 Flaschen	B-SGPG- CONSET	mit 1 ml Inkubations- Puffer versetzen
Enzym-Marker anti-human IgM-HRP in einem Protein Puffer mit Konservierungsstoffen	1 Flasche 11 ml	B-SGPG-ELM	gebrauchsfertig blaue Lösung
TMB Substrat in Citratpuffer mit H_2O_2	1 Flasche 11 ml	B-TMB	gebrauchsfertig
Stopp Lösung 0.25 M H_2SO_4	1 vial 11 ml	B- STS	gebrauchsfertig korrosiv!

Table 3

¹⁾ Der Kalibrator besteht aus verdünntem, positivem Serum, welches gegen eine intern etablierte Referenz, standardisiert wurde (siehe Kapitel Standardisierung und Grenzwert).

²⁾ Die Kontrollen enthalten Lot-abhängige anti-SGPG Antikörper Mengen. Für Konzentrationsangaben siehe beigelegtes Kontrolldatenblatt.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Lagerung bei 2-8°C. Zu verwenden bis zum Ablaufdatum, angegeben auf der Verpackungsetikette.	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Mikrotiter-Platte	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.
Kalibrator	Zu verwenden bis 2 Monate nach Rekonstitution. Bei -20°C lagern.
Kontrollen	
Inkubations-Puffer	Zu verwenden bis zum Verfallsdatum. Bei 2-8°C lagern.
Enzymmarker IgM	
TMB Substrat (vor Licht schützen)	
Stopp-Lösung	Zu verwenden bis zum Verfallsdatum. bei 18-28°C lagern.

Table 4

VORSICHTSMASSAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Kalibrator (B-SGPG-CA) und Kontrollen (B-SGPG-CONSET) enthalten Komponenten humaner Herkunft. Bestandteile humanen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten gemäss Good Laboratory Practice als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- **Substrat- und Stop-Lösung:** Die Substratlösung (B-TMB) enthält Tetramethylbenzidin, Wasserstoff-Peroxid und Dimethylformamide. Die Stop-Lösung (B-STs) enthält Schwefelsäure. Jeder dieser Reagenzien reizt die Augen, die Haut und die Schleimhautmembranen. Berührung mit den Augen, der Haut und die Bekleidung vermeiden. Nach Berührung sofort mit viel Wasser spülen.
- 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.
- Auf Grund des Produktionsprozesses kann es **Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten** haben. Sie werden mit dem 1. Waschen (Schritt 3) entfernt und haben keinen Einfluß auf die Ergebnisse.
- Schritt 3-9: Auf 2-8°C gekühlte Reagenzien sollen in allen diesen Schritten verwendet werden und sie sollen während des Pipettierens kalt gehalten werden.
- Schritte 3, 6, 9: Die Kavitäten müssen nach dem letzten Waschzyklus vollständig entleert werden.
- Schritt 9: 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 Kavitäten 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 kommt.
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten für 2 µl, 100 µl und 1 ml.
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Vorbereitung der Verdünnungsproben.
- 1000 ml Zylinder zur Verdünnung des Waschpuffers.
- Mikrotiter-Platten-Waschgerät oder Spritzflasche für Waschpuffer.
- Mikrotiter-Platten-Schüttler.
- Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter (450 nm)

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Dieser Test benötigt <0.1 ml Blut oder <50 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, Hämolyse vermeiden, eine Stunde lang bei RT (18-28°C) gerinnen lassen, 10 Minuten lang bei RT und 1000 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.

ARBEITSANLEITUNG

Hinweis: In den Schritten 3 - 9 gekühlte (2-8°C) Lösungen verwenden.

1. Patientenproben mit Inkubationspuffer 1:1000 verdünnen (z.B. 2 µl Serum + 2 ml Inkubations-Puffer). Verdünnte Proben gut vortexen und eine Stunde lang bei 18-28°C stehen lassen. Anschließend vor dem Pipettierschritt 4f, die Proben 10 Minuten lang auf Eis inkubieren.
2. Eine Mikrotiter-Platte mit ausreichend Streifen für das Testen der gewünschten Kalibratoren, Kontrollen und Proben vorbereiten. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und sofort mit dem Dessikator einpacken und gekühlt lagern.
3. Mikroküvetten viermal mit jeweils ≥300 µl kaltem Waschpuffer waschen. Waschpuffer dekantieren und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
- 4a. Je 100 µl Inkubations-Puffer in die Mikroküvetten A1 und A2 pipettieren (Blank).
- 4b. Je 100 µl Kalibrator in B1+B2 pipettieren.
- 4c. Je 100 µl Kontrolle tief in C1+C2 pipettieren.
- 4d. Je 100 µl Kontrolle medium in D1+D2 pipettieren
- 4e. Je 100 µl Kontrolle hoch in E1+E2 pipettieren.
- 4f. Je 100 µl der verdünnten Proben im Doppel in die folgenden Mikroküvetten pipettieren.
5. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden (± 5 Minuten) bei 2-8°C inkubieren.

6. Abdeckfolie entsorgen und die Mikroküvetten entleeren und viermal mit jeweils ≥300 µl Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
7. 100 µl Enzymmarker IgM zu jeder Mikroküvette zugeben.
8. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden (± 5 Minuten) bei 2-8°C inkubieren.
9. Abdeckfolie entsorgen und die Mikroküvetten entleeren und viermal mit jeweils ≥300 µl Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

Wichtig: TMB-Substrat auf 18-28°C erwärmen.

10. 100 µl TMB-Substrat zu jeder Mikroküvette zugeben.
11. Mikrotiter-Platte mit Abdeckfolie abdecken und 30 Minuten (±5 Minuten) bei 18-28°C auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler (800-1000 rpm) inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.
12. 100 µl Stopp-Lösung zu jeder Mikroküvette zugeben und allfällige Luftbläschen mit Pipettenspitzen entfernen.
13. Optische Dichte bei 450 nm innerhalb der nächsten 30 Minuten messen.

STANDARDISIERUNG

Der Kalibrator des BÜHLMANN anti-SGPG ELISA Kits wurde an einer internen Referenz kalibriert. Die Referenz besteht aus einem verdünnten positiven Serum. Die Verdünnung wurde so gewählt daß die resultierende OD im Bereich zwischen normalen und positiven Seren liegt.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Kalibrator: Absorption des Kalibrators bei 450 nm ablesen und den gemittelten Blank Wert abziehen. Mittelwerte der Doppelbestimmung der gemessenen Kalibrator-Absorption berechnen. Die Absorption (dividiert durch sich selbst) wird auf 1 gesetzt (Normalisierung).

Proben und Kontrollen: Absorption bei 450 nm ablesen und den gemittelten Blank Wert abziehen. Mittelwerte der Doppelbestimmungen der gemessenen Absorptionen berechnen. Berechnung des Verhältnisses (Ratio) zwischen den Absorptionsmittelwerten der Kontrollen/Proben und des Absorptionsmittelwerts des Kalibrators.

$$\text{Ratio(Verhältnis)} = \frac{\text{Absorptionsmittelwert der Proben}}{\text{Absorptionsmittelwert des Kalibrators}}$$

Table 11. zeigt typische Messwerte für diesen Kit. Die Daten dienen nur als Beispiel. Die Absorptionswerte des Kalibrators und der Kontrollen müssen bei jeder Testdurchführung neu ermittelt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Testpackungsbeilage ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur, durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung erreicht. Bühlmann empfiehlt die Erhebung von Doppelwerten und die Verwendung des daraus berechneten Mittelwerts.

Da es keine kommerziell erhältliche Anti-SGPG Autoantikörper Kontrolle gibt, wird empfohlen, positive Serumproben als interne Qualitätskontrolle anzuwenden.

Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen QC Kontrollblatt angegeben.

Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des etablierten Erwartungsbereiches liegen. Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschließen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Photometer Eichung, iii) Verfallsdaten der Reagenzien, iv) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, v) die TMB Substratlösung sollte farblos sein, vi) Wasserreinheit.

EINSCHRÄNKUNGEN DER LEISTUNGSMERKMALE

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

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision (Within-Run): 4.9%. Die intra-assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung von vier unterschiedlichen Seren im gleichen Ansatz (siehe Table 13).

Inter-Assay Präzision (Run-to-Run): 10.0%. Die inter-assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung von sechs unterschiedlichen Seren in 20 verschiedenen Ansätzen (siehe Table 14).

Verdünnunglinearität: 151%. 13 Humansenen mit erhöhten anti-SGPG Titer wurden mit Inkubations-Puffer 1:1000 bis 1:128'000 verdünnt und für eine Stunde bei 18-28°C stehen gelassen. Die Verdünnungen wurden danach entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Das Verhältnis O/E (beobachtet/erwartet) wurde Schritt für Schritt berechnet (siehe Table 15). Es wird vermutet, daß die relativ hohen Abweichungen der Proben aufgrund von Antikörper Aggregaten zustande kommt. Im Allgemeinen enthalten aber pathologische Seren sehr hohe Autoantikörper Titer, so daß dies keinen Einfluß auf die positiv/negativ Diskriminierung hat.

Nachweisgrenze (LoB): <0.01 Ratio. 20 Doppelansätze mit Inkubations-Puffer wurden gleichzeitig angesetzt. Mittelwert und Standardabweichung wurden für die Absorptionswerte (OD) berechnet. Nach Abzug der Absorptionswerte des Blanks und Kalkulation des Verhältnisses wurde ein Wert von 0.006 erhalten.

Nachweisgrenze (LoQ): <0.15 Ratio. Ein anti-SGPG Autoantikörper positives Serum wurde fortlaufend verdünnt (1:1000-1:100'000). 20 Doppelansätze wurden gleichzeitig angesetzt. Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient (%CV) wurde von den Absorptionswerten berechnet. Ein %CV von 10% wurde bei einem Ratio Wert von 0.145 gefunden (siehe Table 16).

Spezifität: Zwei unterschiedliche Experimente wurden durchgeführt, um die Spezifität des EK-SGPG zu ermitteln:

1. NEUTRALISIERUNG VON ANTI-SGPG AUTOANTIKÖRPER: Zwei Seren mit hohem anti-SGPG Titer konnten durch die Zugabe von freiem SGPG zunehmend inhibiert werden. Dabei wurden aufsteigende Konzentrationen (32 ng bis 1.6 mg SGPG in Eq/Galaktose) den Seren zugegeben und vor dem Messen im EK-SGPG für 16 Stunden bei 4°C vorinkubiert.

2. SPEZIFITÄT DER ANTI-SGPG AUTOANTIKÖRPER BINDUNG: Zehn Seren mit mittel bis hohem anti-Gangliosid Autoantikörper Titer (asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a, GD1b

und GQ1b) sowie fünf negative Seren wurden im EK-SGPG getestet. 9/10 positiven, sowie alle negativen Seren ergaben ein Ratio (Verhältnis) von <0.6. Das als positiv getestete Serum wurde in einer Dünnschichtchromatographie auf anti-SGPG und anti-GD1b Autoantikörper analysiert und als Doppelpositiv bestätigt.

REFENZINTERVALLE UND CUT-OFF RATIO

Vorgeschlagenes Cut-off Verhältnis (Ratio)

Das Normalwertverhältnis von anti-SGPG wurde anhand von 200 Blutproben von asymptomatischen freiwilligen Blutspendern, (49 weiblich, 151 männlich im Alter zwischen 18-70 Jahren) welche entsprechend der Arbeitsanleitung getestet wurden, ermittelt. Nur 1/200 (0.5%) Proben zeigte ein Verhältnis (Ratio) >1. Sechs Seren zeigten ein Verhältnis zwischen 0.5 und 0.6, während 193/200 (96.5%) Seren ein Verhältnis unter 0.5 zeigten.

14 anti-MAG positive Seren wurden getestet. Jedes dieser Seren wies ein Verhältnis 2.4 oder höher auf. Die Resultate sind in Table 12 dargestellt. Bühlmann schlägt die Verwendung eines Cut-off von 1 vor.

Zusätzlich wurde in einer externen Studie bei 223 Seren von vermuteten Neuropathie Patienten der oben genannte Cut-off verifiziert. 178 Seren wurden mit der Referenzmethode, Dünnschichtchromatographie (TLC) wie in der Literatur beschrieben (4), getestet. 99/110 positiven TLC Seren konnten im EK-SGPG auch als positiv gemessen werden. 66/68 TLC negative Seren wurden im ELISA ebenfalls als negativ gemessen. Dies ergibt eine berechnete Sensitivität und Spezifität des ELISA von 90.0% und 97.1%. (persönliche Kommunikation mit Dr. C. Caudie, Lyon).

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse BÜHLMANN anti-SGPG a été conçue pour la détermination diagnostique semi quantitative *in vitro* des auto-anticorps IgM humains dirigés contre les deux glycosphingolipides sulfatés à acide glucuronique (sulfate-3-glucuronyl paragloboside [SGPG] et sulfate-3-glucuronyl-lactosaminyl-paragloboside [SGLPG]) (1-3).

PRINCIPE DU DOSAGE

Le test de dosage des auto-anticorps anti-SGPG ELISA repose sur la technique d'amplification enzymatique quantitative de type "sandwich". La microplaque utilisée est précoâtée de SGPG et de SGLPG provenant de *cauda equina* d'origine bovine. Les calibrateurs, les contrôles et les échantillons sériques de patients sont incubés durant 2 heures dans les puits de la microplaque. Au cours de cette incubation, les auto-anticorps anti-SGPG présents se lient au SGPG bovin coâté. Après lavage des molécules non liées, un anticorps dirigé contre les IgM humaines marqué à la peroxydase de raifort (anti-IgM-HRP) est ajouté dans les puits. La microplaque est incubée pendant 2 heures supplémentaires. Après élimination par lavage des anticorps marqués non liés, la solution contenant le substrat tétraméthylbenzidine (TMB) est ajoutée dans les puits. La microplaque est incubée pendant 30 minutes. Une coloration bleue se développe proportionnellement à la quantité d'auto-anticorps anti-SGPG liés lors de l'étape initiale. La réaction de coloration est stoppée par l'ajout d'une solution stop acide (H₂SO₄) faisant passer la couleur du bleu au jaune. L'intensité de la coloration est déterminée par mesure de l'absorbance à 450 nm dans un lecteur de microplaques. L'absorbance mesurée est directement proportionnelle à la concentration d'auto-anticorps humains anti-SGPG.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque 96 puits, précoâtée-SGPG d'origine bovine	12 barrettes de 8 puits avec support	B-SGPG-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
Calibrateur¹ Sérum humain avec conservateurs	1 flacon	B-SGPG-CA	A reconstituer avec 1 ml de tampon d'incubation
Contrôles Bas, Médium et Elevé² Sérum humain avec conservateurs	3 flacons	B-SGPG-CONSET	A reconstituer avec 1 ml de tampon d'incubation
Marqueur Enzymatique anti-IgM-HRP dans tampon protéiné ; conservateurs	1 flacon 11 ml	B-SGPG-ELM	Prêt à l'emploi Solution bleue
Substrat TMB TMB dans tampon citrate + H ₂ O ₂	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

Table 5

¹ Le calibrateur est produit à partir d'un échantillon positif dilué et standardisé par rapport à une référence interne (cf. paragraphes Standardisation et Valeur Seuil).

² Les contrôles bas, medium et élevé contiennent des quantités d'anticorps anti-SGPG 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)	
A conserver à 2-8°C. Ne pas dépasser la date de péremption imprimée sur l'étiquette.	
Réactifs reconstitués	
Microplaque	Remplacer immédiatement les barrettes de 8 puits non utilisées dans la pochette contenant le dessiccateur puis la refermer soigneusement. Se conserve pendant 2 mois à 2-8°C.
Tampon de Lavage dilué	Se conserve pendant 2 mois à 2-8°C.
Calibrateurs	Se conserve pendant 2 mois à -20°C.
Contrôles	
Tampon d'Incubation	Se conserve à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.
Marqueur Enzymatique	
Substrat de TMB	
Solution Stop	Se conserve à 18-28°C jusqu'à la date de péremption.

Table 6

PRECAUTIONS

PRECAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Le calibrateur (B-SGPG-CA) et les contrôles de cette trousse (B-SGPG-CONSET) 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.
- Substrat TMB et Solution stop:** Le Substrat TMB (B-TMB) contient de la tétraméthylbenzidine (TMB), du peroxyde d'hydrogène et du diméthylfomamide. La Solution stop (B-STs) contient de l'acide sulfurique. Ces substances irritent les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Eviter tout contact avec les yeux, la peau et les habits. En cas de contact accidentel avec les yeux ou la peau, il faut impérativement rincer à grande eau.
- 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.

PRECAUTIONS TECHNIQUES

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. 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.
- Etapes 3-9: Utiliser des réactifs réfrigérés (2-8°C) pour toutes ces étapes et les conserver réfrigérés durant le pipetage.
- Etapes 3, 6, 9: S'assurer de vider les puits complètement après le dernier cycle de lavage.
- Etape 9: S'assurer d'utiliser du substrat TMB préalablement porté à température ambiante (18-28°C).
- Etape 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.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision de 2 µl, 100 µl et 1 ml 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.
- Laveur automatique de microplaques ou une pissette pour le tampon de lavage.
- Agitateur de microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

PRELEVEMENT 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 prévus à cet usage en évitant l'hémolyse, laisser coaguler à température ambiante (18-28°C) pendant 1 heure, centrifuger à environ 1000 x g durant 10 minutes et recueillir le sérum. Conserver les échantillons de sérum à ≤-20°C. Les échantillons se conservent jusqu'à 1 année s'ils sont stockés à ≤-20°C. Eviter les cycles de congélation et de décongélation. Avant utilisation, les échantillons congelés doivent être décongelés et homogénéisés en les agitant doucement ou en inversant le tube de manière répétée.

PROCEDURE

Remarque: utiliser des réactifs réfrigérés au cours des étapes 3. à 9.

1. Diluer au 1:1000 tous les échantillons à analyser avec du tampon d'incubation (ex. 2 µl de sérum et 2 ml de tampon d'incubation). Vortexer délicatement puis laisser reposer les échantillons à 18-28°C durant 60 minutes. Placer les échantillons sur de la glace pendant 10 minutes avant de procéder à l'étape 4f.
2. Préparer une microplaque avec suffisamment de puits pour recevoir blancs, calibrateurs, contrôles et échantillons. Retirer les barrettes en trop du support et les remettre immédiatement dans la pochette prévue à cet effet et contenant le dessiccateur. Les conserver au réfrigérateur.
3. Laver 4 fois chaque puit de la microplaque avec ≥300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et taper fermement la microplaque sur du papier absorbant afin de vider les puits.
- 4a. Distribuer 100 µl de tampon d'incubation (« blanc ») en double dans les puits A1 et A2.
- 4b. Distribuer 100 µl de calibrateur en double dans B1+B2.
- 4c. Distribuer 100 µl de contrôle Bas en double dans C1+C2

4d. Distribuer 100 µl de contrôle Medium en double dans D1+D2.

4e. Distribuer 100 µl les contrôle Elevé en double dans E1+E2.

4f. Distribuer 100 µl les 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 et jeter le film adhésif. Vider puis laver 4 fois chaque puit avec ≥300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant fermement la microplaque sur du papier absorbant.

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 et jeter le film adhésif. Vider puis laver 4 fois chaque puit avec ≥300 µl/puits de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant fermement la microplaque sur du papier absorbant.

Important: Laisser la solution de substrat atteindre une température de 18-28°C avant l'étape 10.

10. Ajouter 100 µl de solution de substrat dans chaque puit.

11. Recouvrir la microplaque d'un film adhésif puis l'incuber sur un agitateur de microplaques à 800-1000 rpm à 18-28°C durant 30 minutes (± 5 minutes). Protéger la microplaque de la lumière directe.

12. Ajouter 100 µl de solution stop dans chaque puit en éliminant les bulles d'air à l'aide de pointes de pipettes. Passer à l'étape 13 dans les 30 minutes suivantes.

13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

STANDARDISATION

Le calibrateur de cette trousse a été calibré à l'aide d'une référence interne produite par dilution d'un échantillon sérique positif. Cette dilution se situe dans l'intervalle des DO des échantillons sériques de donneurs normaux et celles des échantillons positifs.

RESULTATS

Calibrateur : Mesurer l'absorbance à 450 nm (DO₄₅₀) et soustraire la moyenne des « blancs ». Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues. Le ratio du calibrateur est fixé à 1 (divisé par lui-même).

Echantillons et Contrôles : Mesurer l'absorbance à 450 nm (DO₄₅₀) de chaque puits contenant un contrôle ou un échantillon et soustraire la moyenne des « blancs ». Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues. Calculer le ratio de la moyenne d'absorbance obtenue / moyenne d'absorbance du calibrateur.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{moyennette DO}_{450} \text{échantillon}}{\text{moyennette DO}_{450} \text{calibrateur}}$$

Les résultats présentés dans la Table 11 sont donnés à titre d'exemple uniquement. Les valeurs d'absorbance du calibrateur et des contrôles doivent être déterminées pour chaque série d'échantillons mesurée.

CONTROLE QUALITE

Une lecture exhaustive de cette brochure est recommandée pour l'utilisation correcte de cette trousse. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail de laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire) et en suivant fidèlement les instructions contenues dans ce document.

Nous recommandons fortement de travailler en double (blanc, calibrateurs, contrôles et échantillons).

Comme il n'existe pas de sérum anti-SGPG de référence commercialement disponible, nous recommandons l'utilisation d'un pool de sérums positifs en tant que contrôle de qualité interne.

Tous les contrôles doivent avoir une valeur comprise entre les limites de confiance établies. Les limites de confiance des contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont indiquées sur le document de contrôle contenu dans chaque trousse.

La reproductibilité du calibrateur et des contrôles devrait être comprise dans le domaine des valeurs établies par chaque laboratoire. Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de vérifier les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, ii) calibrage des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) conditions de stockage et d'incubation, v) aspect de la solution de substrat TMB : elle doit être incolore, vi) pureté de l'eau.

LIMITATIONS

Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations résultant de l'examen clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision intra-essai (Within-Run): 4.9%. La précision intra-essai a été calculée à partir des mesures de 20 doubles de chaque échantillon lors d'un seul et même essai (cf. Table 13).

Précision inter-essai (Run-to-Run): 10.0%. La précision inter-essai a été calculée à partir des résultats de 20 doubles de 6 échantillons sériques humains lors de 20 essais différents (cf. Table 14).

Linéarité de dilution/ parallélisme: 151%. 13 échantillons sériques humains présentant des taux élevés d'auto-anticorps anti-SGPG élevés furent dilués du 1000^{ème} au 128'000^{ème} (de 1:1000 à 1:128'000), incubés durant une heure à 18-28°C puis dosés selon le protocole standard. Le ratio VO/VA (valeur observée/valeur attendue) a été calculé étape par étape (cf. Table 15). Il est probable que la déviation importante observée pour environ 50% des échantillons soit due à l'agrégation d'anticorps. En général, les échantillons pathologiques présentent des taux d'auto-anticorps très élevés. Cette déviation n'a donc pas d'influence sur l'interprétation des résultats.

Limite de blanc (LoB): <0.01 Ratio. 20 doubles du tampon d'incubation ont été mesurés lors d'un même essai. La moyenne et la déviation standard ont été calculées pour les valeurs d'absorbance (DO). Après soustraction de l'absorbance des « blancs » et calcul des ratios, la valeur de 0.006 a été obtenue.

Limite de quantification (LoQ): <0.15 Ratio. Un échantillon sérique anti-SGPG positif a été dilué (1:1000 à 1:100'000). 20 doubles de chaque dilution ont été testés au cours d'un même essai. La moyenne, l'écart type (SD) et le

coefficient de variation (%CV) des valeurs d'absorbance ont été calculés. Un ratio <0.145 a été obtenu, avec un CV inférieur à 10% (cf. Table 16).

Spécificité: Deux types d'expérimentation ont été pratiqués afin d'évaluer la spécificité du test BÜHLMANN anti-SGPG ELISA:

1. *NEUTRALISATION DES AUTO-ANTICORPS ANTI-SGPG:* La fixation de 2 échantillons sériques présentant des taux élevés d'auto-anticorps anti-SGPG à la microplaque coatée de MAG a pu être inhibée de manière concentration-dépendante après pré-incubation durant 16 heures à 4°C dans du tampon d'incubation additionné concentrations croissantes de SGPG (32 ng à 1.6 µg SGPG) avant de procéder au dosage.

2. *SPECIFICITE DE LIAISON DES AUTO-ANTICORPS ANTI-SGPG:* 10 échantillons sériques présentant des taux moyens à élevés d'auto-anticorps anti-Ganglioside (asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a, GD1b et GQ1b) ainsi que 5 échantillons sériques négatifs furent analysés à l'aide du test anti-SGPG ELISA. 9 échantillons sur les 10 pathologiques ainsi que les 5 échantillons négatifs ont présenté des ratios inférieurs à 0.6. Sur le seul échantillon positif, une recherche d'auto-anticorps anti-SGPG et anti-GD1a a été effectuée par TLC (chromatographie sur couche mince). La présence des deux types d'auto-anticorps a été confirmée par cette méthode.

INTERVALES DES REFERENCES ET VALEURS SEUIL (CUT-OFF)

Le « Background Ratio » d'anti -SGPG a été défini à partir du dosage, selon la procédure standard, des échantillons de 200 donneurs de sang asymptomatiques (49 femmes et 151 hommes âgés de 18 à 70 ans). Seul 1 échantillon sur les 200 testés (0.5%) a présenté un ratio >1. Six échantillons ont présenté un ratio compris entre 0.5 et 0.6, alors que 193 échantillons sur 200 (96.5%) ont présenté des valeurs inférieures à 0.5.

14 échantillons sériques anti-MAG positifs ont également été analysés. Leurs ratios étaient tous ≥ 2.4 . Les résultats se trouvent en (Table 12).

En conséquence, nous proposons une **valeur seuil (cut-off) de 1**.

De plus, au cours d'une étude externe, cette valeur seuil a été vérifiée sur 223 échantillons sériques de patients chez lesquels une neuropathie était suspectée. 178 échantillons furent testés au moyen de la technique de détection (TLC), chromatographie sur couche mince, méthode de référence, décrite dans la littérature (4). 99/110 échantillons TLC positifs le furent également avec l'ELISA anti-SGPG. 66/68 échantillons TLC négatifs le furent également avec l'ELISA anti-SGPG. Ces données permettent de définir une sensibilité de 90.0% et une spécificité de 97.1% pour l'ELISA anti-SGPG (communication personnelle Dr C. Caudie, Lyon, F).

USO

Il test BÜHLMANN anti-SGPG è un test diagnostico semi-quantitativo *in vitro* per la determinazione degli autoanticorpi umani di classe IgM diretti verso il solfato-3-glucoronil paragloboside [SGPG] ed il solfato-3-glucoronil-lattosaminil-paragloboside [SGLPG] (1-3).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Gli autoanticorpi anti-SGPG ELISA utilizzano la tecnica per immunodosaggi quantitativi amplificati enzimaticamente di tipo sandwich. L'SGPG e l'SGLPG altamente purificati da *cauda equina* bovina sono stati precoatati in una micropiastra. Il Calibratore, i Controlli ed i sieri dei pazienti sono incubati per due ore nei pozzetti della micropiastra e gli autoanticorpi anti-SGPG presenti sono legati dall'SGPG bovino adeso. Dopo il lavaggio delle sostanze non legate, vengono aggiunti ai pozzetti anticorpi marcati con perossidasi di rafano (HRP) anti IgM umane ed incubati per altre 2 ore. Dopo il lavaggio, viene aggiunta ai pozzetti la soluzione di substrato contenente tetrametilbenzidina (TMB) ed incubata per 30 minuti. Si ha lo sviluppo di una colorazione blu in proporzione al quantitativo di autoanticorpi anti-SGPG legati nella fase iniziale. Lo sviluppo della colorazione viene bloccato aggiungendo la soluzione bloccante acidica (H₂SO₄) che cambia il colore da blu in giallo. L'intensità dell'assorbanza del colore è misurata con un lettore di micropiastre alla lunghezza d'onda di 450 nm. L'assorbanza misurata è direttamente proporzionale alla concentrazione di autoanticorpi umani anti-SGPG.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropiastra 96 pozzetti precoatati con SGPG bovina	Strip da 12 x 8-pozzetti con supporto	B-SGPG-MP	Pronto all'uso
Foglio sigillante per la piastra	3 fogli		
Tampone di Lavaggio Concentrato (10x) Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-MAG-WB	Diluire con 900 ml di acqua deionizzata
Tampone di Incubazione Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-MAG-IB	Pronto all'uso
Calibratore¹⁾ Siero umano con conservanti	1 flacone	B-SGPG-CA	Aggiungere 1 ml di Tampone di Incubazione
Controllo Basso Medio e Alto²⁾ Siero umano con conservanti	3 flaconi	B-SGPG-CONSET	Aggiungere 1 ml di Tampone di Incubazione
Marcato enzimatico Anti-IgM-HRP in un tampone a base proteica con conservanti	1 flacone 11 ml	B-SGPG-ELM	Pronto all'uso Soluzione Blu
Substrato TMB TMB in un tampone Citrato con Perossido di Idrogeno	1 flacone 11 ml	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione Bloccante 0.25 M di acido solforico	1 flacone 11 ml	B- STS	Pronto all'uso Agente corrosivo

Tabella 7

¹⁾ il Calibratore è composto da un siero positivo diluito standardizzato secondo un riferimento interno stabilito (vedi capitolo standardizzazione e cut-off).

²⁾ Il Controllo Basso, Medio ed Alto contengono quantitativi lotto-specifici di anticorpi anti-SGPG. Fare riferimento ai dati di QC forniti con il kit per i valori corrispondenti.

CONSERVAZIONE ED EMI-VITA DEI REAGENTI

Reagenti Sigillati	
Conservare a 2-8°. Non utilizzare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.	
Reagenti Aperti/Ricostituiti	
Micropiastra	Riporre le strip non utilizzate immediatamente nella busta che contiene il dessiccante e risigillarle 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.
Calibratore	Conservare fino a 2 mesi a -20°C
Controlli	
Tampone di Incubazione	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza
Marcato Enzimatico	
Substrato TMB (proteggere dalla luce)	
Soluzione Bloccante	Conservare a 18-28°C fino alla data di scadenza

Tabella 8

PRECAUZIONI

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- Il calibratore (B-SGPG-CA) ed i controlli di questo kit (B-SGPG-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.
- **Substrato e Soluzione Stoppante:** Il Substrato TMB(B-TMB) contiene tetrametilbenzidina (TMB), perossido di idrogeno e dimetilformamide. La Soluzione Bloccante (B-STs) contiene acido solforico. Ciascuno di questi reagenti è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con gli occhi, la pelle ed il vestiario. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua.
- 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).
- **Punto 3-9:** Utilizzare e mantenere i reagenti refrigerati (2-8°C) durante la dispensazione.
- **Punto 3, 6, 9:** Dopo l'ultimo ciclo di lavaggio delle strip, assicurarsi che i pozzetti siano completamente vuoti.
- **Punto 9:** 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.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso: 2 µl, 100 µl e 1 ml.
- Provette monouso di polistirene o polipropilene per la preparazione delle diluizioni del campione.
- Beuta a cilindro da 1000 ml per la diluizione del Tampone di Lavaggio Concentrato.
- Lavatore per Micropiastra o flacone per il Tampone di Lavaggio.
- Agitatore per micropiastra
- Lettore di micropiastra per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La procedura richiede <0.1 ml di sangue o <50 µl di siero. Non devono essere utilizzati campioni lipemici, emolizzati ed itterici. 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, evitando l'emolisi, lasciare coagulare per un'ora a temperatura ambiente (18-28°C), centrifugare per 10 minuti a circa 1000 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 e scongelamento. I campioni congelati devono essere scongelati e mescolati completamente capovolgendoli o scuotendoli leggermente prima dell'utilizzo.

DOSAGGIO

Nota: dal punto 3 al 9 utilizzare reagenti refrigerati (2-8°C)

1. Diluire tutti i campioni dei pazienti 1:1000 con il Tampone di Incubazione (ad es.: 2 µl di siero + 2 ml di Tampone di Incubazione). Mescolare completamente vortexando e lasciare che i campioni diluiti riposino per 60 minuti a 18-28°C. Collocare i campioni per 10 minuti nel ghiaccio prima di dispensare al punto 4f.
2. Utilizzare una piastra con strip da 8 pozzetti per poter testare il numero desiderato di bianchi campione, calibratori, controlli e campioni. Togliere le strip in eccedenza dal supporto e risigillarle subito nella busta con il desiccante. Conservare refrigerate.
3. Lavare quattro volte le strip coattate utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e blottare la piastra su carta assorbente.
- 4a. Dispensare 100 µl di Tampone di Incubazione in duplicato nei pozzetti A1+A2. (bianco campione)
- 4b. Dispensare 100 µl del Calibratore in duplicato nei pozzetti B1+B2
- 4c. Dispensare 100 µl del Controllo Basso in duplicato nei C1+C2
- 4d. Dispensare 100 µl del Controllo Medio in duplicato nei D1+D2
- 4e. Dispensare 100 µl del Controllo Alto in duplicato nei E1+E2
- 4f. 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. Togliere ed eliminare il foglio sigillante. Lavare la piastra quattro volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e blottare la piastra su carta assorbente.
 7. Aggiungere 100 µl di Marcato Enzimatico (Soluzione blu) a tutti i pozzetti.
 8. Coprire la piastra con un nuovo foglio sigillante, ed incubare per 2 ore (± 5 min) a 2-8°C.
 9. Togliere ed eliminare il foglio sigillante. Lavare la piastra quattro volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e blottare la piastra su carta assorbente.
- Importante: Consentire alla soluzione di substrato TMB di raggiungere temperature ambiente 18-28°C prima di utilizzarlo al punto 10.**
10. Aggiungere 100 µl di Soluzione di Substrato TMB a tutti i pozzetti.
 11. Coprire la piastra e collocarla su di un mixer settato a 800-1000 rpm, proteggerla dalla luce diretta ed incubarla per 30 minuti (± 5 min) a 18-28°C.
 12. Aggiungere 100 µl di soluzione bloccante a tutti i pozzetti. Eliminare le bolle d'aria con una pipetta. Procedere al punto 13 entro 30 minuti.
 13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore di micropiastra.

STANDARDIZZAZIONE

Il Calibratore del kit è stato calibrato verso un pool di riferimento interno (siero positivo diluito). La diluizione è stata scelta nel range tra la OD di donatori normali e sieri positivi.

RESULTATI E CALCOLO

Calibratore: Memorizzare l'assorbanza a 450 nm (OD₄₅₀) e sottrarre il valore medio del bianco campione. Fare la media dei valori duplicati. Il Rapporto del calibratore è settato ad un valore 1 (diviso per se stesso).

Campioni e Controlli: Memorizzare l'assorbanza a 450 nm (OD₄₅₀) per ciascun campione e pozzetto del controllo e sottrarre il valore medio del bianco campione. Fare la media dei valori duplicati. Calcolare il rapporto tra l'assorbanza media del campione e l'assorbanza media del Calibratore.

$$\text{Rapporto} = \frac{\text{medianetta OD}_{450} \text{ del campione}}{\text{medianetta OD}_{450} \text{ del calibratore}}$$

NOTA: Esempio di risultati: vedi Table 11. Questi risultati sono forniti a solo scopo dimostrativo. I valori dell'assorbanza del calibratore e dei controlli devono essere generati per ciascuna seduta analitica.

CONTROLLO DI QUALITA'

E' necessaria una buona comprensione della metodica per poter utilizzare al meglio il prodotto. Risultati affidabili verranno ottenuti solo utilizzando tecniche di laboratorio precise (linee guida GLP aggiornate) e seguendo accuratamente le istruzioni di questa metodica.

Bühlmann consiglia caldamente di testare il bianco campione, il Calibratore, i Controlli ed i campioni in duplicato.

Poiché non vi è nessun siero di controllo disponibile in commercio per gli anticorpi anti-SGPG, consigliamo l'utilizzo di un pool di sieri positivi per i controlli di qualità interni.

Tutti i controlli devono rientrare entro i limiti di confidenza stabiliti. I limiti di confidenza per i Controlli sono lotto-specifici e stampati sul Foglio di Controllo aggiunto.

La riproducibilità dei valori del calibratore e dei controlli deve rientrare entro i limiti di accettabilità del laboratorio. Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, dispositivi di controllo della temperatura e dei tempi; ii) settaggi del lettore ELISA; iii) data di scadenza dei reagenti; iv) condizioni di conservazione e di incubazione; v) la Soluzione di Substrato TMB deve essere incolore; vi) purezza dell'acqua.

LIMITI DELLE PRESTAZIONI

I risultati del test vanno interpretati insieme alle informazioni derivanti dagli studi epidemiologici, dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Precisione Intra-Dosaggio (Intra-Seduta): 4.9%. La precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori ottenuti da quattro sieri umani in un'unica seduta (cf. Table 13)

Precisione Inter-Dosaggio (Da seduta a seduta): 10.0%. La precisione inter-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori ottenuti da 6 sieri umani in 20 sedute diverse (cf. Table 14)

Linearità/Parallelismo di Diluizione: 151%. Tredici campioni di siero umano contenenti titoli elevati di anticorpi anti-SGPG sono stati diluiti con Tampone di Incubazione da 1:1000 a 1:128.000, lasciati per un'ora a 18-28°C e successivamente dosati secondo la procedura del dosaggio. Il rapporto O/A (Osservati/Attesi) è stata calcolata passo passo. (cf. Table 15). La deviazione relativamente elevata in modo particolare ad elevate concentrazioni di anticorpi nei campioni è dovuta alle aggregazioni anticorpali. In generale, i sieri patologici presentano un titolo molto elevato di autoanticorpi, quindi non influenzano la discriminazione tra positivi e negativi.

Limite del Bianco (LoB): <Rapporto 0.01. 20 duplicati del Tampone di Incubazione sono stati dosati in un'unica seduta. La deviazione Media e quella Standard (SD) sono state calcolate a partire dai valori di assorbenza (OD). Dopo aver sottratto il valore di assorbenza del bianco campione ed aver calcolato il rapporto è stato ottenuto un valore di 0.006.

Limite di Quantificazione (LoQ): <Rapporto 0.15. Un siero positivo per gli autoanticorpi anti-SGPG è stato successivamente diluito (1:1000 – 1:100'000). In un'unica seduta sono stati dosati 20 duplicati di ciascuna diluizione. La media, la deviazione standard (SD) ed il coefficiente di variazione (% CV) sono stati calcolati dai valori di assorbenza. E' stato riscontrato un rapporto <0.145 con un CV inferiore al 10% (cf. Table 16).

Specificità: Sono stati effettuati due set di esperimenti per determinare la specificità del Kit BÜHLMANN anti-SGPG ELISA:

1. NEUTRALIZZAZIONE DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-SGPG: due sieri con titoli elevati di anti-SGPG potrebbero essere ulteriormente inibiti dal legame alle micropiastre coattare con SGPG in maniera dipendente dalla concentrazione se preincubati per 16 ore a 4°C con Tampone di Incubazione a cui sono state aggiunte concentrazioni crescenti di SGPG (32 ng to 1.6 µg SGPG in Eq/galattosio) prima di effettuare il test in ELISA.

2. SPECIFICITA' DEL LEGAME DEGLI AUTOANTICORPI ANTI-SGPG: dieci sieri con titoli medi ed alti di autoanticorpi anti-Ganglioside (asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b) e cinque sieri negativi sono stati testati con il dosaggio anti-SGPG ELISA. 9/10 di questi sieri positivi per la patologia e tutti i sieri negativi hanno prodotto un rapporto inferiore a 0.6. Il campione testato come positivo è stato ulteriormente dosato utilizzando la cromatografia a strato sottile (TLC) per gli autoanticorpi anti-SGPG ed anti-GD1a. L'esistenza di entrambi i tipi di anticorpi può essere confermata con TLC.

INTERVALLOS DE REFERENZIA E CUT-OFF

Rapporto di Cut-Off Sugerito

Il Rapporto di Background del kit anti-SGPG è stato determinato utilizzando 200 campioni di sangue da donatori volontari asintomatici (49 femmine, 151 maschi di età compresa tra 18 e 70 anni) che sono stati testati secondo la procedura del dosaggio. Soltanto 1/200 (0.5%) dei campioni hanno presentato un Rapporto di > 1. Sei sieri hanno presentato un Rapporto tra 0.5 e 0.6, mentre 193/200 (96.5%) sieri hanno presentato un rapporto al di sotto di 0.5.

Sono stati testati 14 sieri positivi anti-MAG. Ciascun siero ha presentato un Rapporto di 2.4 o superiore. I risultati sono elencati in Table 12. Quindi proponiamo un **Rapporto di cut-off di 1.**

Inoltre, in uno studio esterno comprendente 223 sieri di pazienti affetti da una sospetta neuropatia, è stato verificato il cut-off più sopra proposto. Sono stati testati 178 sieri con il metodo di riferimento (TLC) cromatografia a strato sottile descritto in letteratura (4). 99/110 sieri positivi con TLC sono stati testati positivi con il kit anti-SGPG ELISA. 66/68 sieri negativi con TLC sono stati testati negativi con ELISA. Questo risultato ha comportato una sensibilità ed una specificità dell'ELISA del 90.0% e del 97.1% rispettivamente (comunicazione personale del Dr. C.Caudie, Lyon, F.).

USO ESPECÍFICO

El test anti-SGPG BÜHLMANN se ha diseñado para realizar la determinación diagnóstica *in vitro* cuantitativa de anticuerpos IgM humanos dirigidos contra el sulfato-3-glucuronil-paraglobósido [SGPG] y el sulfato-3-glucuronil-lactosaminil-paraglobósido [SGLPG] (1-3).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

El enzimoimmunoanálisis (ELISA) de autoanticuerpos anti-SGPG utiliza la técnica cuantitativa de inmunoanálisis intercalado con amplificación enzimática. Se ha recubierto previamente una placa de microtitulación con SGPG y SGLPG altamente purificados de *cauda equina* de origen bovino. Los sueros del calibrador, de los controles y de los pacientes se incuban durante dos horas en los pocillos de microtitulación y los autoanticuerpos anti-SGPG presentes se unen al SGPG bovino inmovilizado. Después de eliminar con el lavado las sustancias no unidas, se añaden a los pocillos anticuerpos contra IgM humana marcados con peroxidasa de rábano (HRP) y se incuba durante dos horas más. Después de un lavado se añade a los pocillos la solución sustrato que contiene tetrametilbenzidina (TMB), y se incuba durante 30 minutos. Se desarrolla una coloración azul proporcional a la cantidad de autoanticuerpos anti-SGPG unidos en el paso inicial. El desarrollo del color se detiene con la adición de una solución de interrupción ácida (H₂SO₄) que vira la solución de azul a amarillo. La intensidad de la absorbancia del color se mide en un lector de placas de microtitulación a una longitud de onda de 450 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la concentración de autoanticuerpos anti-SGPG humano.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Placa de microtitulación 96 pocillos recubiertos con SGPG bovino	12 tiras de 8 pocillos con soporte	B-SGPG-MP	Listo para usar
Sellador de placas	3 unidades		
Tampón de lavado concentrado (10x) con conservantes	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
Calibrador¹⁾ Suero humano con conservantes	1 vial	B-SGPG-CA	Añadir 1 ml de tampón de incubación
Controles bajo medio y alto²⁾ Suero humano con conservantes	3 viales	B-SGPG-CONSET	Añadir 1 ml de tampón de incubación
Marcador de enzima Anticuerpo anti-IgM humana conjugado con HRP en un tampón de proteínas con conservantes	1 vial 11 ml	B-SGPG-ELM	Listo para usar Solución azul
Substrato TMB TMB en tampón citrato con peróxido de hidrógeno	1 vial 11 ml	B-TMB	Listo para usar
Solución de interrupción Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 11 ml	B-STS	Listo para usar Agente corrosivo

Tabla 9

¹⁾ El calibrador consiste en una muestra diluida de suero positivo que se ha estandarizado según una referencia interna establecida (véase el capítulo sobre estandarización y corte).

²⁾ Los controles bajo, medio y alto contienen cantidades de anticuerpos anti-SGPG específicas del lote. Consulte la hoja de datos de control de calidad que viene con el kit para ver los respectivos cocientes.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Almacenar a 2-8°C. No utilizar el kit después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Placa de microtitulación	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	Almacenar hasta 2 meses a 2-8°C.
Calibrador	Almacenar hasta 2 meses a 2-8°C.
Controles	
Tampón de incubación	Almacenar a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Marcador de enzima	
Substrato de TMB (protéjase de la luz)	
Solución de interrupción	Almacenar a 18-28°C hasta la fecha de caducidad.

Tabla 10

PRECAUCIONES

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Los calibradores (B-SGPG-CA) y los controles (B-SGPG-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 sustrato y solución de interrupción:** La solución sustrato (B-TMB) contiene tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrógeno y dimetilformamida. La solución de interrupción (B-STS) contiene ácido sulfúrico. Los dos reactivos pueden irritar los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Después del contacto con los ojos o la piel lave inmediatamente con agua abundante.
- 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 lavar los pocillos y no tienen ninguna influencia en los resultados (véase a punto 3 de la instrucción de uso).
- Pasos 3-9: Utilice los reactivos refrigerados (2-8°C) en todos estos pasos y mantínelos a 2-8°C mientras de pipetear.
- Pasos 3, 6 y 9: Cerciórese de vaciar los pocillos totalmente después del último ciclo que de lavado.
- Paso 9: 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.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables: pipetas de 2 µl, 100 µl y 1 ml.
- 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.
- Lavador de placas de microtitulación o botella flexible para el tampón de lavado.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

El procedimiento requiere <0,1 ml de sangre o <50 µl de suero. No deben utilizarse muestras lipémicas, hemolíticas o ictericas en este ensayo. Se pueden evitar las muestras lipémicas pidiendo a los pacientes que no coman como mínimo durante las 12 horas anteriores a la toma de la muestra. Recoja la sangre en tubos limpios, evite la hemólisis, deje coagular durante una hora a temperatura ambiente (18-28°C), centrifugue durante 10 minutos a aproximadamente 1000 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.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Nota: utilice sólo reactivos refrigerados (2-8°C) en los pasos 3 a 9.

1. Diluya todas las muestras del paciente 1:1000 con el tampón de incubación (p.ej. 2 µl de suero + 2 ml de tampón de incubación). Mezcle completamente con un agitador vortex y deje las muestras diluidas durante 60 minutos a 18-28°C. Coloque las muestras en hielo durante 10 minutos antes de pipetear en el paso 4f.
2. Utilice una placa con las suficientes tiras de 8 pocillos para probar el número requerido de blancos, calibradores, controles y muestras. Retire las tiras sobrantes del soporte y vuelva a guardarlas junto con los dos sacos desecantes sin demora. Almacénelo refrigerado.
3. Lave las tiras recubiertas cuatro veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
- 4a. Pipetee 100 µl de tampón de incubación por duplicado en los pocillos A1+A2.

- 4b. Pipetee 100 µl de calibrador por duplicado en B1+B2.
- 4c. Pipetee 100 µl de control bajo por duplicado en C1+C2.
- 4d. Pipetee 100 µl de control medio por duplicado en D1+D2.
- 4e. Pipetee 100 µl de control alto por duplicado en D1+D2.
- 4f. Pipetee 100 µl de cada muestra diluido por duplicado en los pocillos subsiguientes.
5. Cubra la placa con un sellador de placa e incube durante 2 horas (± 5 minutos) a 2-8°C.
6. Retire y deseche el sellador de placa. Lave la placa cuatro veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
7. Añada 100 µl de marcador de enzima (solución azul) a todos los pocillos.
8. Cubra la placa con un sellador de placas nuevo e incube durante 2 horas (± 5 minutos) a 2-8°C.
9. Retire y deseche el sellador de placa. Lave la placa cuatro veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

Importante: deje que la solución sustrato de TMB alcance 18-28°C antes de su uso en el paso 10.

10. Añada 100 µl de la solución sustrato de TMB a todos los pocillos.
11. Cubra la placa y colóquela en un agitador de placas ajustado a 800-1.000 rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 30 minutos (± 5 minutos) a 18-28°C.
12. Añada 100 µl de solución de interrupción a todos los pocillos. Elimine las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Continúe con el paso 13 al cabo de 30 minutos como máximo.
13. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS Y CÁLCULOS

Calibrador: Registre la absorbancia a 450 nm (DO_{450}) y réstele el valor promedio de los blancos. Calcule el promedio de los valores duplicados. El valor del cociente del calibrador se establece en 1 (dividido por sí mismo).

Muestras y controles: Registre la absorbancia a 450 nm (DO_{450}) para cada pocillo de las muestras y de los controles, y réstele el valor promedio de los blancos. Calcule el promedio de los valores duplicados. Calcule el cociente entre la absorbancia media de las muestras y la absorbancia media del calibrador.

$$\text{Cociente} = \frac{DO_{450 \text{ netamedia de la muestra}}}{DO_{450 \text{ netamedia del calibrador}}}$$

Importante: Podrá encontrar un ejemplo de los resultados en Table 11. Se deben generar valores de absorbancia del calibrador y los controles para cada conjunto de muestras que se vaya a ensayar.

ESTANDARIZACIÓN

El calibrador del kit está calibrado frente a una reserva de referencia interna (muestra diluida de suero positivo). La dilución se escogió dentro de un intervalo entre la densidad óptica (DO) de donantes de sangre normales y muestras de suero positivo.

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario comprender totalmente estas instrucciones de uso para que la utilización del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente este prospecto.

BÜHLMANN recomienda encarecidamente probar el calibrador, los controles y las muestras por duplicado.

Dado que no hay suero de control para anticuerpos anti-SGPG disponible comercialmente, recomendamos el uso de una reserva de suero positivo para los controles de calidad internos.

Todos los controles deben encontrarse dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos adicional.

La reproducibilidad de los valores del calibrador y de los controles debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) ajustes del lector de ELISA iii) fechas de caducidad de los reactivos iv) condiciones de almacenamiento e incubación v) la solución sustrato con TMB debe ser incolora vi) pureza del agua.

LIMITACIONES

Los resultados del ensayo deben interpretarse considerando la información disponible de estudios epidemiológicos, la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Precisión intra-ensayo (dentro de la prueba): 4,9%. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores de cuatro muestras de suero humano obtenidos en una única prueba (cf. Table 13).

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 10,0%. La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores de 6 muestras de suero humano obtenidas en 20 pruebas distintas (cf. Table 14).

Linealidad/paralelismo de dilución: 151%. Se diluyeron con tampón de incubación (de 1:1.000 a 1:128.000) 13 muestras de suero humano que contenían titulaciones altas de anticuerpos anti-SGPG, se dejaron en reposo durante una hora a 18-28°C y a continuación se analizaron según el procedimiento del ensayo. El cociente O/E (observado / esperado) se calculó paso a paso (cf. Table 15). Se cree que la desviación relativamente alta de las muestras, sobre todo en concentraciones elevadas de anticuerpos, se debe a las agregaciones de anticuerpos. En general, las muestras patológicas de suero muestran una titulación de autoanticuerpos muy elevada, por lo que no afecta a la discriminación positiva / negativa.

Límite para el blanco (LoB): cociente <0,01. Se ensayaron 20 duplicados de tampón de incubación en una única prueba. Se calcularon la media y la desviación estándar (DE) de los valores de absorbancia (DO). Al restar el valor de absorbancia de los blancos y calcular el cociente, se obtuvo un valor de 0,006.

Límite de cuantificación (LoQ): cociente <0,15. Se diluyó una muestra de suero positivo a autoanticuerpos anti-SGPG (1:1.000-1:100.000). Se ensayaron 20 duplicados de cada dilución en una única prueba. Se calcularon la media, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (%CV) de los valores de absorbancia. Se obtuvo

un cociente <0,145 con un CV inferior al 10% (cf. Table 16).

Especificidad: Se realizaron dos tipos de experimentos para evaluar la especificidad del ELISA anti-SGPG BÜHLMANN:

1. NEUTRALIZACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI-SGPG: Se pudo inhibir progresivamente, según la concentración, la unión a las placas de microtitulación recubiertas con SGPG de dos muestras de suero con titulaciones altas de anti-SGPG al incubarlas durante 16 horas con tampón de incubación a 4°C con un suplemento creciente de SGPG (de 32 ng a 1,6 µg en Eq/galactosa) antes del ensayo del ELISA.

2. ESPECIFICIDAD DE LA UNIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI-SGPG: Se analizaron 10 muestras de suero de titulación media y alta de autoanticuerpos anti-gangliósido (asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a, GD1b y GQ1b) y 5 muestras de suero negativo con el ELISA anti-SGPG. Se observó un cociente inferior a 0,6 en 9 de 10 de las muestras de estas enfermedades y en todas las muestras de suero negativo. La muestra positiva se analizó también con una cromatografía de capa fina (TLC) para autoanticuerpos anti-SGPG y anti-GD1a. La existencia de ambos tipos de anticuerpos se confirmó en la TLC.

INTERVALOS DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE

Cociente de corte propuesto

El cociente de referencia del anti-SGPG se determinó a partir de 200 muestras de donantes de sangre voluntarios asintomáticos (49 mujeres y 151 hombres de entre 18 y 70 años) que se analizaron según el procedimiento del ensayo. Sólo 1/200 de las muestras (0,5%) mostró un cociente superior a 1. Seis muestras de suero presentaron un cociente entre 0,5 y 0,6, mientras que 193/200 (96,5%) mostraron valores del cociente por debajo de 0,5.

Se analizaron 14 muestras de suero positivo anti-MAG. Se observó un cociente de 2,4 o superior en todas las muestras de suero. Los resultados aparecen en Table 12. Por lo tanto, proponemos un **cociente de corte de 1**.

Asimismo, el cociente de corte propuesto se verificó en un estudio externo con 223 muestras de suero de pacientes con sospecha de neuropatía. Se analizaron 178 muestras de suero con el método de referencia de cromatografía de capa fina (TLC), descrito en la bibliografía (4). 99 de las 110 muestras de suero positivo analizadas con TLC dieron positivo en el ELISA anti-SGPG. 66 de las 68 muestras de suero negativo analizadas con TLC dieron negativo en el ELISA. Como resultado, se calcula que el ELISA tiene una sensibilidad y especificidad del 90,0% y 97,1%, respectivamente (comunicación personal del Dr. C. Caudie, Lyon, Francia).

Table 11: Examples of results

	OD _{450nm}	Mean OD _{450nm}	Mean Ratio
Blank	0.039		
Calibrator	0.378		
Calibrator	0.318	0.348	1.00
Control LOW	0.010		
Control LOW	0.012	0.011	0.03
Control MEDIUM	0.294		
Control MEDIUM	0.226	0.260	0.75
Control HIGH	0.834		
Control HIGH	0.731	0.783	2.25
Sample 1	0.953		
Sample 1	0.850	0.902	2.6
Sample 2	0.522		
Sample 2	0.537	0.530	1.5

Table 15 Dilution Linearity/Parallelism

Sample Type	Range [min – max]	Mean [Observed/Expected]
Serum 4HF	100-114%	112%
Serum 5K	169-200%	175%
Serum 1C	86-133%	108%
Serum 2G	108-164%	141%
Serum 3GL	80-121%	110%
Serum 5	133-175%	161%
Serum 6	140-196%	180%
Serum 7	114-200%	157%
Serum 8	166-192%	175%
Serum 1	133-186%	171%
Serum 2	133-183%	161%
Serum 3	120-192%	164%
Serum 4	165-200%	185%
Mean		154%

Table 12 Cut-off Ratio

	Ratio	
	Normal blood donors (n=200)	anti-MAG pos. sera (n=14)
Mean	0.20	3.67
SD	0.14	0.58
Min	0.07	2.36
Max	1.48	4.61
Mean+3SD	0.61	
Mean-3SD		1.92
95% percent.	0.48	

Table 16 Functional Sensitivity

Sample Type	dilution	Ratio	SD	%CV
Serum 1	1:1	2.8	0.1	4.5
Serum 1	1:2	1.2	0	4.1
Serum 1	1:10	0.37	0.03	7.5
Serum 1	1:20	0.22	0.01	5.6
Serum 1	1:50	0.13	0.01	11.1
Serum 1	1:100	0.07	0.04	60.0

%CV =10% at a Ratio of 0.145

Table 13 Intra-assay Precision

Sample Type	Mean Ratio	SD	CV(%)
Serum 1	3.8	0.3	7.6
Serum 2	2.8	0.1	4.5
Serum 3	2.1	0.1	3.3
Serum 2 dil.	1.2	0.05	4.1
Mean			4.9

Table 14 Inter-assay Precision

Sample Type	Mean Ratio	SD	CV(%)
Serum 1	4.2	0.5	11.3
Serum 5	4.1	0.3	6.9
Serum 3	2.6	0.3	12.0
Serum 2	2.1	0.1	6.2
Serum 2 dil.	1.2	0.1	10.2
Serum 2 dil.	0.5	0.1	13.4
Mean			10.0

Table description: cf. “Results” (page Fehler! Textmarke nicht definiert.), “Standardization and Cut-Off” (page 4) and “Performance Characteristics” (page 4)

Tabellenbeschreibung: Siehe “Resultate” (Seite Fehler! Textmarke nicht definiert.), „Standardisierung und Cut-off“ (Seite Fehler! Textmarke nicht definiert.) und „Leistungsmerkmale“ (Seite 7)

Explications relatives aux tableaux : voir « Résultats » (page 9), « Standardisation et valeurs seuil » (page 10) et « Caractéristiques de Performance » (page 10)


Descrizione tavola: cf. “Risultati” (pagina 12), “Standardizzazione e Cut-off” (pagina Fehler! Textmarke nicht definiert.) e “Caratteristiche di Prestazione” (pagina 13).

Explicaciones relativas a las Tablas: ver “Resultados” (página Fehler! Textmarke nicht definiert.), Estandarización y corte” (página Fehler! Textmarke nicht definiert.) y “Características de Eficiencia” (página 16)


1. Ariga T, *et al.*: Characterization of sulphated glycuronic acid containing glycolipids reacting with IgM M-proteins in patients with Neuropathy. *J Biol Chem* 262(2),848-853 (1987).
2. Burger et al.: Anti-myelin-associated glycoprotein antibodies in patients with a monoclonal IgM gammopathy and polyneuropathy, and a simplified method for the preparation of glycolipid antigens. *J Immunol Meth* 140; 31-36 (1991).
3. Baumann N.: Specificity of antiglycolipid antibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 19;31-40 (2000)
4. Campant RM et al.: Détection des anticorps anti-myéline: mise au point et evaluation dans 75 cas de neuropathies associées à une IgM monoclonale. *Ann Biol Clin* 57;69-75 (1999)

Anti-SGPG ELISA

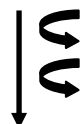
Precoated Microtiter Plate

 *wash 4 x*


100 µL Calibrator, Controls or Serum Samples (1:1000)

 *incubate 2 hours (\pm 5 min) at 2-8°C*
wash 4 x

add 100 µL Enzyme Label

 *incubate 2 hours (\pm 5 min) at 2-8°C*
wash 4 x

add 100 µL TMB Substrate





 *incubate 30 minutes (\pm 5 min) at 18-28°C*
on a plate rotator

add 100 µL Stop Solution

Read absorbance at 450 nm (within 30 minutes)

➔ TIME TO RESULT: 4.5 HOURS

APPENDIX IV
SYMBOLS/SYMBOLE/ SYMBOLES/SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
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>
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
MP	Microtiter Plate Mikrotiter-Platte Microplaque Micropiastra Microplaca

Symbol	Explanation
BUF WASH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Tampon de lavage concentré (10x) Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (10x)
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone di incubazione Tampón de incubación
CAL	Calibrator Kalibrator Calibrateur Calibratore Calibrador
CONTROL L	Low Control Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
CONTROL M	Medium Control Kontrolle medium Contrôle médium Controllo medio Control medio
CONTROL H	High Control Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
EL IgM	Enzyme Label IgM Enzymmarker IgM Marqueur enzymatique IgM Marcato enzimatico IgM marcada enzimáticamente IgM
SUBS TMB	TMB Substrate TMB Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato de TMB
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada



Printing Date
2013-01-30