



anti-IFN β BAB

anti-Interferon beta Binding Antibodies

ELISA

EK-IFNB 96 tests

Revision date: 2012-11-13

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN anti-IFN β ELISA kit is intended for the direct and quantitative *in vitro* diagnostic determination of IgG antibodies to therapeutically administered Interferon- β (IFN β) in human serum (1-10).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Serum from Multiple Sclerosis (MS) patients treated with interferon- β and suspected to contain antibodies (Ab) to the substance administered, calibrators and controls are incubated in microtiter wells coated with a mix of different IFN β molecules (natural human IFN β , IFN β -1a and IFN β -1b). After removal of unreacted material by washing, a horseradish peroxidase (HRP)-labelled antibody to human IgG is added to the wells.

After a second washing step, the TMB Substrate (tetramethylbenzidine) is added to the wells and color develops in proportion to the amount of anti-IFN β binding antibodies bound in the initial step. The reaction is terminated by the addition of stop solution and the color absorbance is measured in a microtiter plate reader at a wavelength of 450nm.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Microtiter Plate Precoated with human-IFN β , rec. IFN β -1a & rec. IFN β -1b	12 x 8 wells	B-IFNB-MP	Wash twice before use
Plate Sealer	3 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10x) With preservatives	1 vial 100 ml	B-IFNB-WB	Dilute with 900 ml of deionized water
Incubation Buffer With preservatives	1 vial 100 ml	B-IFNB-IB	Ready to use
Calibrators A to D¹⁾ pool of lyoph. human serum containing anti-IFN β IgG	4 vials 1 ml	B-IFNB- CASET	Reconstitute each vial with 1 ml of Incubation Buffer; vortex
Control Low / High²⁾ Lyoph. human serum	2 vials 1 ml	B-IFNB- CONSET	Reconstitute each vial with 1 ml of Incubation buffer; vortex
Enzyme Label Anti-human IgG conjugated HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 ml	B-IFNB-ELG	Ready to use
TMB Substrate TMB in citrate buffer with H ₂ O ₂	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 Calibrators A, B, C and D contain 500, 200, 80 and 20 BTU of human anti-IFN β IgG antibodies, respectively.

²⁾ The Controls contain lot-specific amounts of human anti-IFN β IgG antibodies. Refer to the additional QC Data Sheet for actual concentrations.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Store at 2-8°C. Do not use past kit expiration date.	
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 until expiration date at 2-8°C.
Wash Buffer	Store for up to 2 months at 2-8°C after dilution.
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	
TMB Substrate	
Stop Solution	Stable at 18-28°C until expiration date printed on the label.

Table 2

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The Microtiter Plate (B-IFNB-MB), Calibrators (B-IFNB-CASET) and Controls (B-IFNB-CONSET) of this kit contain components of human origin.

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- The Microtiter Plate (B-IFNB-MP), Calibrators (B-IFNB-CASET) and Controls (B-IFNB-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:** Substrate and Stop Solution: The Substrate TMB (B-TMB) contains Tetramethylbenzidine, hydrogen peroxide (H₂O₂) and dimethylformamide. The Stop Solution (B-STs) contains sulfuric acid (0.25 M). Each of those reagents is irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with Eyes, skin and cloths. Wear suitable protective clothing, gloves and eye protection. 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

- **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.
- 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.
- 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.
- Let the reagents adjust to reach room temperature. Mix well (vortex) the reagents before use.
- Microwells cannot be re-used.

ELISA Procedure:

- In the ELISA procedure the **washing step is essential** to guarantee reproducible results. A **minimal incubation time** of the Wash Buffer in the wells **of at least 20 seconds** must be ensured each time. The indicated no. of **washing cycles is mandatory** to ensure reproducible results.
- When using **automated washer**, BÜHLMANN strongly recommends using "plate mode" i.e. each process step (dispense/aspiration) is performed on all of the strips sequentially, before processing to the next process step. Thus, the minimal incubation time is guaranteed.
- The enzyme used as the label is inactivated by oxygen and is highly sensitive to sodium azide, thimerosal, hypochlorous acid and aromatic chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies. Therefore, use only deionized high quality water.
- The sample dilution (1:50) is considered in the concentration specification of the Calibrators. Therefore, the amount of

BTU present in the unknown sample can be directly read by interpolation with the standard curve.

- If the initial concentration of an unknown sample is greater than the highest Calibrator, the serum sample should be further diluted with Incubation Buffer and assayed again according to the assay procedure. The additional dilution must be considered when calculating the actual concentration of BTU present in the unknown sample.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes with disposable tips: 20 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 the Wash Buffer.
- Blotting paper.
- Refrigerator.
- Microtiter plate rotator.
- Microtiter plate reader for the measurement of absorbance at 450 nm.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The procedure calls for 20 µl of serum per duplicate determination. Collect blood into plain tubes, avoid hemolysis, mix by inverting sample tube several times and leave to clot for 45 minutes at room temperature (18-28°C) protected from light. Centrifuge at 2000 x g for 15 minutes at room temperature (18-28°C) and collect the 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.

Store the serum samples at -20°C if not assayed within the same day. Repeated freezing and thawing of samples may decrease antibody activity.

ASSAY PROCEDURE

1. Dilute all patient samples 1:50 with Incubation Buffer (e.g. 20 µl of serum + 980 µl of Incubation Buffer). Allow diluted samples to set for 30 minutes at 18-28°C prior to pipetting in step 4d.
2. Prepare a plate with sufficient strips to test the desired number of Calibrators, Controls and samples. Remove excess strips from the holder and re-seal them in the plastic foil bag containing the desiccant bags **without delay**. Store refrigerated.
3. Wash the coated strips twice 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 in duplicate into the wells A1+A2 as reagent blank.
- 4b. Pipet 100 µl of Standard A in duplicate into wells B1+B2. Pipet 100 µl of Standard B in duplicate into wells C1+C2. Pipet 100 µl of Standard C in duplicate into wells D1+D2. Pipet 100 µl of Standard D in duplicate into wells E1+E2.
- 4c. Pipet 100 µl of Low Control in duplicate into wells F1+F2. Pipet 100 µl of High Control in duplicate into wells G1+G2.
- 4d. Pipet 100 µl of each diluted sample in duplicate into the subsequent wells.
5. Cover with a Plate Sealer and incubate for 2 hours (± 5 minutes) at 2-8°C.
6. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and wash three 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 to all wells.

8. Cover the plate with a Plate Sealer and incubate for 2 hours (± 5 minutes) at 2-8°C.
9. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and wash three 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 reach 18-28°C before use in step 10.
10. Add 100 µl of the TMB Substrate Solution to each well.
11. Cover the plate with a Plate Sealer, place the plate on a plate mixer set at 800-1000 rpm, protect the plate from direct light and incubate for 30 minutes (± 5 minutes) 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 standards of the anti-IFNβ BAB ELISA kit were calibrated against internal reference material.

Bühlmann Titer Units (BTU) were established as follows:

- Normal donor samples as well as samples from MS patients before IFNβ treatment were assayed according to the anti-IFNβ BAB ELISA assay procedure (*cf.* table below).
- Serially diluted samples of the reference pool were assayed in the same run.
- The **dilution** at which the reference pool falls short of the cut-off of the control samples, mentioned in first step, corresponds to the **titer** of the reference pool, expressed in Bühlmann Titer Units (BTU).

NOTE: Serum titer values depend on the assay method and, in particular, on the specificity and the cut-off values established with a given assay method. Titer values obtained with different assay methods cannot be compared directly.

RESULTS AND CALCULATION

Standard Curve: Record the absorbance at 450 nm for each Calibrator and Blank (NSB) well. Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells (NSB) and record the averages (= corrected average absorbance). Plot the corrected average absorbance (vertical axis) versus the Bühlmann Titer Units (BTU) of the standards (horizontal axis) using a lin/log graph paper. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a smoothed spline fitting algorithm.

Samples and Controls: Record the absorbance at 450 nm for each sample and control well. Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells and record the averages (= corrected average absorbance). Locate the corrected average absorbance value of the samples and controls on the vertical axis, draw a horizontal line intersecting the standard curve and read the Bühlmann Titer Units (BTU) from the horizontal axis.

Typical Data: See Table 11 and Figure 1 for typical data (results and standard curve). *These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed. The BÜHLMANN QC laboratory uses a smoothed spline curve fit.*

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this instruction for use 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 instruction for use.

Since there is no control serum for anti-IFN β -BAB commercially available, we recommend using a positive serum pool for internal quality control. The confidence limits for the BÜHLMANN Controls are lot-specific and printed on the additional QC Data Sheet.

The reproducibility of standard curve parameters 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.

LIMITATIONS

- The reagents supplied with this kit are optimized to measure antibodies directed against injected interferon- β in human serum.
- Anti-IFN β antibody titer value should be used as supplementary data available to the physician in monitoring IFN β treatment.
- Serum titer values depend on the assay method and, in particular, on the specificity and the cut-off values established with an assay method. Titer values obtained with different assay methods cannot be compared directly.
- 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): 4.7%. The intra-assay precision was calculated from the results of 35 and 48 pairs of values, respectively, in a single run. The values are presented in Table 12 as Bühlmann Titer Units (BTU) of anti-IFN β BAB.

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 12.9%. The inter-assay precision was calculated from the results of 7 pairs of values in 21 different runs. The values are presented in Table 13 as Bühlmann Titer Units (BTU) of anti-IFN β BAB.

Dilution Linearity/Parallelism: 102.4%. Six anti-IFN β BAB positive serum samples containing different concentrations of IFN β binding antibodies, were differentially diluted with Incubation Buffer and assayed according to the assay procedure. The values are presented in Table 14 as Bühlmann Titer Units (BTU) of anti-IFN β BAB.

Detection limit (LoB): 5 BTU: Twenty duplicates of Incubation Buffer were assayed in a single run. Mean and standard deviation (SD) were calculated for the absorbance values. The minimum detectable dose of IFN β BAB was calculated to be 4.92 BTU by adding two SD to the mean absorbance of the reagent blank (Incubation Buffer) and intersecting this value with the standard curve obtained in the same run.

Specificity: Three sets of experiments were performed to assess the specificity of the anti-IFN β BAB ELISA:

1. Comparison to Immunodot Blot: Thirteen patient samples containing elevated titers of anti-IFN β antibodies (106 to 784 BTU) showed in a Immunodot Blot corresponding low to high *Relative Titer Units*. Four patient

samples showing results below the technical cut-off (6 to 35 BTU) were also negative in the Immunodot Blot.

2. Neutralization of anti-IFN β BAB by pre-incubation with IFN β : A strong, concentration-dependent inhibition of binding to the microtiter plates was observed, when anti-IFN β BAB positive sera were pre-incubated with Incubation Buffer containing 0.1 to 10 μ g/ml of IFN β -1a, IFN β -1b, natural human IFN β or mixes thereof. Different concentrations (0.1 – 10 μ g/ml) of IFN γ did not exhibit substantial effects on the binding of anti-IFN β antibodies from treated MS patients to the microtiter plate.

3. Specificity of anti-IFN β BAB binding: Sera with positive anti-IFN β BAB were tested on plates coated under the same condition, but without IFN β . All results obtained were negative or significantly below the technical cut-off.

Patient sera containing different pathological autoantibodies (i.e. anti-nuclear-Ab, anti-Ganglioside-Ab and anti-MAG-Ab) as well as Circulating Immune Complex positive sera showed results (0 to 23 BTU) significantly below the technical cut-off.

Method Comparison: 35 serum samples of IFN β -1a and IFN β -1b treated patients were analyzed using the BÜHLMANN anti-IFN β BAB ELISA and the MxA Stimulation Test, respectively. The presence of IFN β induces the synthesis of the antiviral MxA protein in human cells. Neutralizing anti-IFN β antibodies can decrease the effect of IFN β and, therefore their specific activities can be determined by reduced MxA production (quantification by ELISA). All sera containing neutralizing antibodies were also positive in the anti-IFN β BAB ELISA. Then there were no falsely negative results observed. The cut-off applied for the anti-IFN β BAB positive/ negative discrimination was 50 BTU. The comparison results are displayed in Table 15 (K.M. Myhr, et al. 1999, Poster at Scand. Neurol. Meeting). A second study with 242 serum samples from 39 patients treated either with IFN β -1a or IFN β -1b were analyzed using the BÜHLMANN anti-IFN β BAB ELISA and the cytopathic effect assay (CPE), respectively. The presence of IFN β protects human cells from virally mediated cell lysis. Neutralizing anti-IFN β antibodies can decrease the effect of IFN β and, therefore, their specific activities can be determined by increased cell lysis. The cut-off applied for the anti-IFN β BAB positive/negative discrimination was 50 BTU. The comparison results are displayed in Table 16 (A. Bertolotto, Torino IT, pers. communication).

REFERENCE INTERVALS

The frequency of anti-IFN β binding antibodies (anti-IFN β BAB) in normal human serum was determined using blood samples from 200 asymptomatic volunteer blood donors (100 men and 100 women each at the age of 18-72 years) and from 44 clinically positive Multiple Sclerosis (MS) patients before the onset of IFN β treatment, respectively. All samples were assayed according to the assay procedure and the results obtained are given in Table 17, expressed in Bühlmann Titer Units (BTU).

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

Proposed Technical Cut-Off: Elimination of the four values > mean + 3 S.D. would result in a cut-off value (mean + 3 S.D.) of 43 BTU. For practical reasons, we recommend to use a theoretical **cut-off value of 50 BTU**. Similarly, the mean + 3 S.D. value calculated from 44 clinically diagnosed MS patients, but not under IFN β therapy, would result in a theoretical cut-off value of 42

BTU which is highly corresponding to that of normal blood donors.

Clinical Cut-Off: Dependent on the clinical question we recommend to establish, so-called clinical cut-offs. 1) In order to a screening application of the anti IFN β BAB ELISA in IFN β treated MS patients a clinical cut-off of 30 BTU is the best choice to find virtually all potential NAB positive candidates (11). 2) To study a possible direct correlation between the BAB titer and its clinical consequences, an elevated cut-off is recommended (e.g. 80 BTU or higher).

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN anti-IFN β ELISA Kit wird für die direkte und quantitative *in vitro* diagnostische Bestimmung von IgG Antikörper gegen therapeutisch verabreichtes Interferon- β (IFN β) in humanem Serum verwendet (1-10).

PRINZIP DER METHODE

Serum von Interferon- β behandelten Multiple Sklerose (MS) Patienten, welches potentiell Antikörper (Ak) gegen dieses Protein enthält, wird zusammen mit Kalibratoren und Kontrollen in der Mikrotiter-Platte inkubiert, die mit einem Mix aus verschiedenen IFN β Molekülen (natural human IFN β , IFN β -1a and IFN β -1b), beschichtet ist. Nach dem Wegwaschen ungebundener Substanzen werden Meerrettich-peroxidase (HRP)-markierte Antikörper (Ak) gegen humanes IgG zu der Platte zugegeben.

Nach dem Wegwaschen der ungebundenen Antikörper, wird die Tetramethylbenzidin (TMB)-enthaltende Substratlösung zu der Platte zugegeben. Dieser Schritt bewirkt eine Farbreaktion deren Stärke sich proportional zur Menge der im ersten Reaktionsschritt gebundenen anti-IFN β bindenden Antikörper verhält. Die Zugabe einer Stopp-Lösung beendet die enzymatische Reaktion und bewirkt einen Farbumschlag. Die optische Dichte der Lösung wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr	Rekonstitution
Mikrotiter-Platte Beschichtet mit h-IFN β , rec. IFN β -1a & rec. IFN β -1b	12 x 8 Küvetten	B-IFNB-MP	Vor Gebrauch zweimal waschen
Abdeckfolien	3 Stück		
Waschpuffer Konzentrat (10x) Konservierungsstoffe	1 Flasche 100 ml	B-IFNB-WB	Mit 900 ml deionisiertem Wasser verdünnen
Inkubations-Puffer Konservierungsstoffe	1 Flasche 100 ml	B-IFNB-IB	Gebrauchsfertig
Kalibratoren A - D¹⁾ Lyoph. Mischung anti-IFN β IgG enthaltender humaner Seren	4 Flaschen 1 ml	B-IFNB-CASET	Jede Flasche mit 1 ml Inkubations-Puffer rekonstituieren
Kontrolle tief / hoch²⁾ Lyoph. humanes Serum	2 Flaschen 1 ml	B-IFNB-CONSET	Jede Flasche mit 1 ml Inkubations-Puffer rekonstituieren
Enzym-Marker HRP-markierter anti-IgG Ak in Puffermatrix. Konservierungsstoffe	1 Flasche 11 ml	B-IFNB-ELG	Gebrauchsfertig
TMB Substrat Gepuffertes TMB mit H ₂ O ₂	1 Flasche 11 ml	B-TMB	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M H ₂ SO ₄	1 Flasche 11 ml	B-STTS	Gebrauchsfertig korrosiv

Tabelle 3

¹⁾ Die Kalibratoren A, B, C und D enthalten 500, 200, 80 und 20 BTU human anti-IFN β IgG Antikörper.

²⁾ Die Kontrollen enthalten Lot-spezifische Mengen von humanen anti-IFN β IgG Ak. Siehe zusätzliches QC Kontrollblatt für die genauen Konzentrationen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8°C lagern. Verfallsdatum beachten	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Mikrotiter-Platte	Ungebrauchte Streifen sofort in die mit Dessikator versetzte Packung zurückbringen. Packung gut verschliessen. Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C haltbar.
Wasch-Puffer	2 Monate nach der Verdünnung bei 2-8°C lagern.
Kalibratoren	2 Monate bei -20°C lagern.
Kontrollen	
Inkubations-Puffer	Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C lagern
Enzym-Marker	
TMB Substrat	Bis zum Verfallsdatum bei 18-28°C lagern
Stopp-Lösung	

Tabelle 4

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Die Mikrotiterplatte (B-IFNB-MP), Kalibratoren (B-IFNB-CASET) und Kontrollen (B-IFNB-CONSET) dieses Tests enthalten 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-STC) 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

- 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.
- 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.
- 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.
- Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen und mischen (vortexen).
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.

ELISA

- Die korrekte Durchführung der in der Arbeitsvorschrift beschriebenen **Waschschritte** ist essentiell, um reproduzierbare Resultate zu garantieren. Eine **minimale Inkubationszeit des Waschpuffers** in der Kavität **von mindestens 20 Sekunden** muss bei jedem Waschschritt eingehalten werden.
- Wird ein **Waschautomat** eingesetzt, muss der „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass jeder Schritt (Einfüllen) erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor der nächste Schritt (Absaugen) gestartet wird. Somit kann die minimale Inkubationszeit gewährleistet werden.
- Die angegebene Anzahl von **Waschschritten muss eingehalten** werden, um reproduzierbare Resultate zu gewährleisten.
- Damit die Antigen-Antikörper-Reaktion vollständig ablaufen kann, muss die **Inkubationszeit in Schritt 5** mindestens 30 Minuten betragen. Leicht längere Inkubationszeiten (bis zu 5 Minuten) zeigen dagegen keinen Einfluss auf das Endresultat.
- Das verwendete Marker-Enzym wird durch O₂ inaktiviert und ist gegenüber Na-Azid, Thimerosal, Hypochlorsäure und aromatische Chlor-Kohlenwasserstoffe hochempfindlich, daher wird empfohlen nur deionisiertes Wasser zu verwenden.

- Es wird empfohlen, Kalibratoren, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung zu testen. Die Standardkurve muss bei jedem Testansatz bestimmt werden. „Vertikale Anordnung“ wird empfohlen.
- Die Verdünnung der Patientenproben (1:50) ist in der Konzentrationsangabe der Kalibratoren berücksichtigt. Daher kann die Menge der BTU in der gemessenen Probe direkt durch Interpolation mit der Standardkurve ermittelt werden.
- Falls die Konzentration in einer Probe höher ist als der Wert des höchstkonzentrierten Kalibrators, muss die betreffende Serumprobe mit Inkubationspuffer verdünnt werden, um sie nochmals laut Anleitung zu messen. Diese höhere Verdünnung muss bei der Berechnung der BTU in der Probe berücksichtigt werden.

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 Wasch-Puffers.
- Microtiter-Platten-Waschgerät oder Spritzflasche für Waschpuffer.
- Kühlschrank
- Saugfähiges Papier.
- Microtiter-Platten-Schüttler.
- Microtiter-Platten-Photometer mit optischem Filter (450 nm).

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Für diesen Test werden 20µl Serum bei Bestimmung im Duplikat benötigt. Die Blutproben in den entsprechenden Röhrchen sammeln, Hämolyse vermeiden und 45 Minuten lang lichtgeschützt bei RT (18-28°C) gerinnen lassen. 15 Minuten bei RT (18-28°C) und 2000 x g zentrifugieren, danach Serum sammeln.

Lipämische, hämolytische oder ikterische Blutproben sollten nicht verwendet werden. Lipämische Proben können vermieden werden, indem der Patient mindestens 12 Stunden vor der Blutentnahme keine Nahrung zu sich nimmt.

Falls die Serumproben nicht am gleichen Tag gemessen werden können, müssen diese bei ≤-20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren/Auftauen kann zum Verlust der Antikörperaktivität führen.

HINWEIS: Verdünnte Serumproben nicht aufbewahren.

ARBEITSANLEITUNG

1. Patientenproben mit dem Inkubations-Puffer 1:50 verdünnen (z.B. 20 µl Serum + 980 µl Inkubations-Puffer. 30 Minuten bei 18-28°C stehen lassen, bevor diese im Schritt 4d weiter verarbeitet werden.
2. für das Testen der gewünschten Kalibratoren, Kontrollen und Proben, eine Mikrotiter-Platte mit ausreichenden Streifen vorbereiten. Die ungebrauchten Streifen vom Halter entfernen und sofort mit dem Dessikator einpacken und gekühlt lagern.
3. Mikroküvetten zweimal mit jeweils ≥300 µl Wasch-Puffer 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 A in die Mikroküvetten B1 und B2 pipettieren.
Je 100 µl Kalibrator B in die Mikroküvetten C1 und C2 pipettieren.
Je 100 µl Kalibrator C in die Mikroküvetten D1 und D2 pipettieren.

- Je 100 µl Kalibrator D in die Mikroküvetten E1 und E2 pipettieren.
- 4c. Je 100 µl Kontrolle tief in die Mikroküvetten F1 und F2 pipettieren.
Je 100 µl Kontrolle hoch in die Mikroküvetten G1 und G2 pipettieren.
- 4d. Je 100 µl der verdünnten Serumproben in die nächsten Mikroküvetten pipettieren.
5. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden (±5 Minuten) bei 2-8°C inkubieren.
6. Abdeckfolie entsorgen, die Mikroküvetten entleeren und dreimal mit jeweils ≥300 µl Wasch-Puffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
7. 100 µl Enzym-Marker zu den entsprechenden Mikroküvetten zugeben.
8. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden (±5 Minuten) bei 2-8°C inkubieren.
9. Abdeckfolie entsorgen, die Mikroküvetten entleeren und dreimal mit jeweils ≥300 µl Wasch-Puffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
- Wichtig: TMB-Substratlösung vor dem Gebrauch im Schritt 10 auf 18-28°C erwärmen.**
10. 100 µl TMB-Substrat zu jeder Mikroküvette zugeben.
11. Mikrotiter-Platte mit Abdeckfolie abdecken und 30±5 Minuten bei 18-28°C auf einem Mikrotiter-Plattenschüttler bei 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

Die Kalibratoren des anti-IFNβ BAB ELISA Kits wurden gegen eine interne Referenz kalibriert.

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

- Der Antikörpergehalt in Proben normaler Blutspender und in Proben von MS- Patienten, wurde im anti-IFNβ BAB 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 dem Titer der Referenzprobe in Bühlmann Titer Units.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Eichkurve: Optische Dichte aller mit Kalibrator oder Blank gefüllten Mikroküvetten bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der netto Absorptionsmittelwerte wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Blanks von demjenigen der Kalibratoren subtrahiert. Korrigierter Absorptionsmittelwert (Vertikalachse) gegen die Titer-Einheiten (in BTU) der Kalibratoren (Horizontalachse) auf einem semi-logarithmischen (lin/log) Papier auftragen. Optimale „best fitting curve“ Eichkurve zeichnen oder mit einem vier Parameter Algorithmus berechnen.

Proben und Kontrollen: Optische Dichte der Proben und Kontrollen bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der netto Absorptionsmittelwerte wird der Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnet und der Mittelwert des Blanks von demjenigen der Proben und Kontrollen subtrahiert. Konzentration der Proben und Kontrollen in BTU aus der Eichkurve lesen, indem der netto Absorptionsmittelwert auf

die Eichkurve aufgetragen wird und den entsprechenden Titer (in BTU) aus der Horizontalachse bestimmt wird.

Siehe Table 11 und Figure 1 für ein Beispiel von Resultaten und Eichkurve. *Diese Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testansatzes danach zu berechnen. Für jeden Probenansatz muss jeweils eine Eichkurve neu ermittelt werden.*

QUALITÄTSKONTROLLE

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

Da es kein kommerziell erhältliches Kontrollserum für anti-IFNβ-BAB gibt, wird empfohlen, positive Serumproben (Pool) als interne Qualitätskontrolle anzuwenden.

Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des etablierten Erwartungsbereiches liegen. Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen QC Datenblatt angegeben.

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) Lagerungs- und Inkubations-Bedingungen, v) die TMB Substratlösung sollte farblos sein, vi) Wasserreinheit.

LEISTUNGSEINSCHRÄNKUNG

- Die Reagenzien dieses Kits sind für die Messung von Antikörpern gegen verabreichtes interferon-β in humanem Serum optimiert.
- Die Werte des Anti-IFNβ Ak-Titer sollten als zusätzliche Daten zur Kontrolle der IFNβ- Behandlung vom Arzt benützt werden.
- Die Serumtiter sind abhängig von der verwendeten Methode, und daher von der dadurch festgelegten Spezifität und den Cut-offs. Aus diesem Grund kann man Werte, die mit anderen Methoden ermittelt wurden nicht mit diesem Test vergleichen.
- Die Ergebnisse sollten in Verbindung mit der Anamnese des Patienten und weiteren diagnostischen Tests verwendet werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Precision (Within-Run): 4.7%. Die Intra-Assay Präzision wurde bestimmt durch jeweils 35 und 48 Wertepaaren, gemessen in einem Ansatz. Die Resultate sind in Table 12 in BTU angegeben.

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 12.9%. Die Inter-Assay Präzision wurde bestimmt durch die Doppelbestimmung von sieben Proben in 21 verschiedenen Ansätzen. Die Resultate sind in Table 13 in BTU angegeben.

Verdünnungslinearität: 102.4%. Sechs anti-IFNβ BAB positive Serumproben mit verschiedenen Konzentrationen von IFNβ bindenden Antikörpern wurden mit Inkubations-Puffer seriell verdünnt, und danach gemäss Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Table 14 in BTU angegeben.

Nachweisgrenze (LoB): 5 BTU. Zwanzig Doppelbestimmungen mit Inkubations-Puffer wurden im gleichen Ansatz durchgeführt. Mittelwert und Standardabweichung der Absorptionswerte wurden berechnet. Die minimale nachweisbare Menge wurde durch Addition von zwei

Standardabweichungen zum Mittelwert (Inkubations-Puffer) und danach durch Intersektion auf der Standardkurve ermittelt. Diese beträgt 4.92 BTU für anti-IFN β Antikörper.

Spezifität: Drei Experimenteinheiten wurden durchgeführt um die Spezifität des anti-IFN β BAB ELISA zu ermitteln:

1. Vergleich zum Immunodot Blot: 13 Patientenproben, die erhöhte anti-IFN β -Ak-Titer aufwiesen (106 bis 784 BTU), zeigten auch im Immunodot Blot vergleichbare tiefe bis hohe, relative Titer Units. Vier Patientenproben, welche Werte unter dem technischen Cut-off (6 bis 35 BTU) zeigten, waren auch bei Messung mit dem Immunodot Blot im negativen Bereich.

2. Neutralisierung von anti-IFN β BAB durch Vorinkubation mit IFN β : Eine starke, konzentrationsabhängige Inhibition der Bindung an der Mikrotiter-Platte konnte beobachtet werden, wenn anti-IFN β BAB positive Seren mit Inkubationspuffer vorinkubiert wurden, der 0.1 bis 10 μ g/ml IFN β -1a, IFN β -1b, natürliches humanes IFN β , oder eine Mischung dieser Moleküle aufwies. Verschiedene IFN γ Konzentrationen (0.1 – 10 μ g/ml) hatten keine Wirkung auf die Bindung von anti-IFN β Antikörpern aus behandelten MS Patienten an die Mikrotiter-Platten.

3. Spezifität der anti-IFN β BAB Bindung: IFN β BAB positive Seren wurden auf Mikrotiter-Platten getestet, die unter Standardbedingungen beschichtet wurden, allerdings ohne IFN β . Die erzielten Resultate waren alle negativ, bzw. deutlich unter dem technischen Grenzwert. Gemessene Patientenseren, die verschiedene pathologische Autoantikörper enthielten (z.B. anti-nuclear-Ak, anti-Ganglioside-Ak und anti-MAG-Ak) sowie Seren mit zirkulierenden Immunkomplexen zeigten Resultate die deutlich unter dem technischen Grenzwert (0 bis 23 BTU) lagen.

Methodenvergleich: 35 Serumproben von IFN β -1a und IFN β 1b behandelten Patienten wurden einerseits mit dem BÜHLMANN anti-IFN β BAB ELISA und andererseits mit dem MxA Stimulations-Test gemessen. IFN β induziert die Synthese des antiviralen MxA Proteins in humanen Zellen. Neutralisierende anti-IFN β Antikörper können die Wirkung des IFN β einschränken. Daher kann die spezifische Aktivität dieser Antikörper durch verminderte MxA Produktion (ELISA-Messung) bestimmt werden. Alle gemessenen Seren, die neutralisierende anti-IFN β Antikörper enthielten, waren auch positiv in der anti-IFN β BAB ELISA Messung. Der angewandte Grenzwert für die anti-IFN β BAB positiv/negativ Unterscheidung betrug 50 BTU. Die Resultate dieses Vergleichs sind in Table 15 dargestellt (K.M. Myhr, et al. 1999, Poster at Scand. Neurol. Meeting). In einer zweiten Studie wurden 242 Serumproben aus 39 IFN β -1a oder IFN β -1b behandelten Patienten, mit dem BÜHLMANN anti-IFN β BAB ELISA einerseits, und dem Cytopathic Effect Assay (CPE) andererseits, analysiert. IFN β schützt humane Zellen vor virusinduzierter Zelllyse. Neutralisierende anti-IFN β Antikörper können die Wirkung des IFN β einschränken, und damit kann die spezifische Aktivität dieser Antikörper durch erhöhte Lyse bestimmt werden. Der angewandte Grenzwert für die anti-IFN β BAB positiv/negativ Unterscheidung betrug 50 BTU. Die Resultate dieses Vergleichs sind in Table 8 dargestellt (A. Bertolotto, Torino IT, pers. communication).

REFERENZBEREICHE UND GRENZWERTE (CUT-OFF)

Die Frequenz der anti-IFN β BAB in humanem Serum von gesunden Probanden, wurde mit 200 Blutproben von asymptomatischen Blutspendern (100 männliche und 100 weibliche Erwachsene im Alter von 18 zu 72 Jahren), und von 44 klinisch positive MS Patienten, vor dem Beginn der

IFN β Behandlung ermittelt. Alle Proben wurden entsprechend der Arbeitsanleitung getestet, und die in Table 17 angegebenen Ergebnisse wurden erhalten.

HINWEIS: Diese Titerbereiche sollten nur als Richtwerte verwendet werden. Es wird empfohlen, dass jedes Labor eigene Wertbereiche für Kontroll- und Patientenpopulationen ermittelt und festlegt.

Vorgeschlagener Grenzwert (Cut-Off): Nach der Eliminierung von 4 Werten $>$ Mittelwert + 3SD ergibt sich ein Grenzwert von 43 BTU. Aus praktischen Gründen empfiehlt es sich einen **theoretischen Grenzwert (Cut-Off) von 50 BTU** zu wählen.

Ebenfalls ergibt der Mittelwert+3SD aus den 44 klinisch diagnostizierten MS Patienten, die nicht mit IFN β behandelt wurden, einen Wert von 42 BTU als theoretischen Grenzwert, was dem der Normalspender entspricht.

Klinischer Cut-Off: Es wird empfohlen entsprechend der klinischen Fragestellung sogenannte klinische Grenzwerte zu etablieren. i) Für Screening von IFN β behandelten MS Patienten stellt ein klinischer cut-off von 30 BTU eine angemessene Grösse dar, um alle potentiellen NAB positiven Kandidaten zu bestimmen (11). ii) Um eine mögliche Korrelation zwischen dem BAB Titer und der daraus resultierenden klinischen Folgen zu ermitteln, wird ein höherer klinischer Grenzwert von 80 BTU oder höher empfohlen.

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse anti-IFN β ELISA a été conçue pour la détermination diagnostique *in vitro* directe et quantitative des anticorps IgG présents dans le sérum ou le plasma humain et dirigés contre l'interféron- β (IFN β) administré thérapeutiquement (1-10).

PRINCIPE DU DOSAGE

Les sérums de patient atteints de sclérose en plaque (MS) traités avec de l'interféron- β (IFN β) et suspectés de contenir des anticorps (Ac) contre l'IFN β administré, les Calibrateurs et les Contrôles sont incubés dans une microplaque enduite d'un mélange de différentes molécules d'IFN β (IFN β humain naturel, IFN β -1a et IFN β -1b). Après élimination des molécules libres par lavage, un anticorps (Ac) dirigé contre les IgG humaines et conjugué à la peroxydase du raifort (HRP), est ajouté dans les puits. Le substrat de la HRP (tétraméthylebenzidine ou TMB) est ajouté dans les puits après un deuxième lavage. Une coloration bleue se développe, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps liants anti-IFN β initialement capturés par la microplaque. La réaction est terminée par l'adjonction d'une solution stop acide qui provoque un changement de couleur du bleu au jaune. Le titre des anticorps anti-IFN β est déterminé par la mesure de l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque enduite d'un mélange d'IFN β humain et d' IFN β -1a et IFN β -1b rec.	12 x 8 puits	B-IFNB-MP	A laver 2 fois avant emploi
Films adhésifs	3 pièces		
Tampon de lavage concentré (10x) avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-IFNB-WB	A reconstituer avec 900 ml d'eau désionisée
Tampon d'incubation avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-IFNB-IB	Prêt à l'emploi
Calibrateurs A à D¹⁾ pool de sérum humain lyoph. contenant des IgG anti-IFN β	4 flacons 1 ml	B-IFNB-CASET	Reconstituer chaque flacon avec 1 ml de Tampon d'incubation
Contrôles bas/élevé²⁾ sérum humain lyophilisé	2 flacons 1 ml	B-IFNB-CONSET	Reconstituer chaque flacon avec 1 ml de Tampon d'incubation.
Marqueur enzymatique Ac anti-IgG humaines, conjugué à la HRP avec conservateurs	1 flacon 11 ml	B-IFNB-ELG	Prêt à l'emploi
Substrat TMB TMB dans un tampon citrate avec H ₂ O ₂	1 flacon 11 ml	B-TMB	Prêt à l'emploi
Solution stop Acide sulfurique 0.25 M	1 flacon 11 ml	B-STTS	Prêt à l'emploi Corrosif

Table 5

¹⁾ Les Calibrateurs A, B, C et D contiennent respectivement 500, 200, 80 et 20 BTU d'anticorps IgG humains anti-IFN β .

²⁾ Les Contrôles contiennent des quantités spécifiques à chaque lot d'anticorps IgG humains anti-IFN β . Pour les concentrations exactes, il convient de se référer aux limites de confiance communiquées avec chaque lot de production.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts	
Stables à 2-8°C. Ne pas utiliser après la date de péremption.	
Réactifs ouverts / Reconstitués	
Microplaque	Replacer immédiatement les barrettes de 8 puits non utilisées dans la pochette contenant le dessiccateur puis la refermer soigneusement. Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.
Tampon de lavage	Stable durant 2 mois à 2-8°C après dilution.
Calibrateurs	Stables durant 2 mois à -20°C après dilution.
Contrôles	
Tampon d'incubation	
Marqueur enzymatique	
Substrat TMB	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.
Solution stop	
	Stable à 18-28°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.

Table 6

PRECAUTIONS

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- La Microplaque (B-IFNB-MP), les Calibrateurs (B-IFNB-CASET) et les Contrôles (B-IFNB-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.
- **Substrat et Solution Stop:** Le Substrat (B-TMB) contient du tétraméthylbenzidine (TMB), du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et du diméthylfomamide. La Solution stop (B-STTS) contient de l'acide sulfurique. Ces substances irritent les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Eviter par conséquent 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.

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

- **Les puits de la microplaque** peuvent être recouverts de **résidus** 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.
- 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 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.
- Laisser les réactifs équilibrer à la température ambiante. Reconstituer les réactifs lyophilisés comme indiqué. Bien mélanger (au vortex) les réactifs avant utilisation.
- Les micropuits sont à usage unique.

Procédure de l' ELISA

- Le lavage est un point important de l'ELISA. Pour garantir la reproductibilité des résultats il est nécessaire que le tampon de lavage incube à chaque fois un minimum de 20 secondes dans les puits de la plaque.
- Bühlmann recommande, lors de l'utilisation d'un laveur de plaque automatique, le choix du mode "Plaque" avec lequel chaque étape (remplissage/aspiration) est effectuée sur

toute la plaque avant de passer à l'étape suivante. De cette façon le temps d'incubation minimum est garanti.

- Il est obligatoire de respecter le nombre de cycle de lavage pour l'obtention de résultats fiables.
- Le temps d'incubation de l'étape 5 ne doit pas être inférieur à 30 minutes pour assurer l'interaction complète entre l'antigène et l'anticorps. Des temps d'incubation un peu plus longs (jusqu' à 5 minutes) n'ont pas d'influence sur le résultat final.
- L'enzyme (HRP) utilisée comme marqueur est inactivée par l'oxygène et est hautement sensible à l'azoture de sodium, au thimérosal, à l'acide hypochloreux, ainsi qu'aux hydrocarbures chlorés couramment rencontrés dans l'eau. N'utiliser par conséquent que de l'eau déionisée ou distillée de bonne qualité.
- Il est recommandé de mesurer calibrateurs, contrôles et échantillons en double à chaque fois qu'un dosage est effectué. Comme les conditions varient d'essai à essai, une courbe d'étalonnage doit être établie pour chaque nouveau dosage. L'alignement vertical est recommandé.
- La dilution des échantillons (1 part de sérum dans 50 de Tampon d'incubation) a été prise en considération dans la spécification des concentrations des Calibrateurs. Le titre de l'échantillon inconnu (en BTU) peut donc être lu directement par interpolation de la courbe d'étalonnage.
- Si la concentration initiale d'un échantillon présente un signal plus élevé que le calibrateur le plus haut, l'échantillon doit être dilué à l'aide du Tampon d'incubation et dosé à nouveau selon la procédure standard. Le facteur de dilution doit être pris en compte lors des calculs finaux en BTU.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 20 µl, 100µl et 1 ml.
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène pour la préparation des dilutions d'échantillons.
- Cylindre gradué de 1000 ml pour la préparation du Tampon de lavage.
- Laveur automatique de microplaques ou une pissette pour le Tampon de lavage.
- Papier absorbant.
- Réfrigérateur.
- Agitateur de microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La procédure requiert 20 µl de sang par dosage en duplicata. Prélever le sang dans des tubes vides prévus à cet effet en évitant l'hémolyse. Homogénéiser en inversant le tube plusieurs fois et laisser le sang, protégé de la lumière, coaguler durant 45 minutes à 18-28°C. Centrifuger durant 15 minutes à 2000 x g et 18-28°C.

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. Conserver les échantillons à $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Les cycles répétés de congélation et décongélation peuvent diminuer l'activité des anticorps.

STANDARDISATION

Les calibrateurs de la trousse B ont été calibrés à l'aide d'une référence interne. Les **Bühlmann Titer Units (BTU)** (ou unités de titrage Bühlmann) ont été établies comme suit:

- Les échantillons des donneurs normaux ainsi que de malades atteints de sclérose en plaques avant traitement

à l'IFN β ont été testés selon le protocole standard du test anti-IFN β BAB ELISA.

- Des dilutions en série d'échantillons du pool de référence ont été testées 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 unités de titrage Bühlmann (BTU).

PROCEDURE

1. Diluer au 1:50 tous les échantillons avec le Tampon d'incubation (par ex., 20 µl de sérum + 980 µl de Tampon d'incubation). Laisser reposer les dilutions durant 30 minutes à 18-28°C avant leur utilisation à l'étape 4d.
 2. Préparer une microplaque avec suffisamment de puits pour recevoir tous les calibrateurs, contrôles et échantillons nécessaires. Retirer les barrettes excessives du support et les placer **immédiatement** au froid dans la pochette prévue à cet effet contenant le dessiccateur.
 3. Laver deux fois chaque puits avec au moins 300 µl de Tampon de lavage. Vider les puits et frapper sèchement la microplaque sur du papier absorbant afin de sécher les puits.
 - 4a. Distribuer 100 µl de Tampon d'incubation en double dans les puits A1 et A2 (blanc).
 - 4b. 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.
 - 4c. 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.
 - 4d. Distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué (1:50) en double dans les puits suivants.
 5. Couvrir la microplaque à l'aide d'un film adhésif fourni et incubé à 2-8°C pendant 2 heures (± 5 minutes).
 6. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver chacun des puits trois fois avec ≥ 300 µl de Tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en frappant sèchement la microplaque contre du papier absorbant.
 7. Ajouter 100 µl de Marqueur enzymatique dans tous les puits.
 8. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incubé à 2-8°C durant 2 heures (± 5 minutes).
 9. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver chacun des puits trois fois avec ≥ 300 µl de Tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en frappant sèchement la microplaque contre du papier absorbant.
- Important : Porter le Substrat TMB à une température de 18-28°C avant son utilisation à l'étape 10.
10. Ajouter 100 µl de Substrat TMB dans chaque puits.
 11. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incubé avec agitation à 800-1000 rpm pendant 30 (± 5) minutes à 18-28°C. Protéger la microplaque de la lumière directe.
 12. Ajouter 100 µl de Solution stop dans chaque puits. Eliminer les bulles d'air à l'aide d'une pointe de pipette puis passer à l'étape 13 durant les 30 minutes suivantes.
 13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

CALCULATION DES RESULTATS

Courbe d'étalonnage : Mesurer l'absorbance à 450 nm de chaque puits contenant un blanc (NSB) ou un calibrateur. Calculer la moyenne des deux valeurs d'absorbance obtenues, soustraire la moyenne des blancs (NSB) et noter les valeurs calculées de l'absorption moyenne corrigée. Reporter l'absorbance moyenne corrigée (axe vertical)

contre les titres des calibrateurs en BTU (axe horizontal) sur un papier à quadrillage semi-logarithmique (lin/log). Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression («spline smoothed fitting algorithm»).

Echantillons et Contrôles : Mesurer l'absorbance à 450 nm de chaque échantillon. Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues, soustraire la moyenne des blancs et reporter les valeurs d'absorption moyenne nette. Reporter la valeur d'absorbance nette de l'échantillon sur l'axe vertical de la courbe d'étalonnage. Reporter l'absorbance nette de l'échantillon sur la courbe d'étalonnage et lire le titre correspondant (en BTU) sur l'axe horizontal.

Résultats Typiques: Voir Table 11 et Figure 1 pour un exemple de résultats et de courbe d'étalonnage typiquement obtenus. Ces résultats et courbes d'étalonnage sont donnés à titre d'exemple uniquement. Une courbe d'étalonnage doit être déterminée pour chaque série d'échantillons à doser.

CONTROLE DE QUALITE

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte du produit. Des résultats fiables ne seront obtenus 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 référence pour les anticorps anti-IFN β -BAB commercialement disponible, nous recommandons l'utilisation d'un pool de sérum positif comme référence interne de contrôle de qualité. Les limites de confiance des Contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont indiquées sur la feuille de contrôle contenue dans chaque trousse.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage et des valeurs des contrôles devrait être comprise dans le domaine des valeurs attendues établi 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 contrôler 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) le Substrat TMB devrait être incolore, vi) pureté de l'eau.

LIMITATIONS

- Les réactifs fournis dans cette trousse sont optimisés pour le dosage des anticorps dirigés contre l'interféron- β injecté dans le sérum ou plasma humain.
- Les titres d'anticorps anti-IFN β devraient être utilisés comme données supplémentaires disponibles au médecin pour le suivi du traitement par IFN β .
- La valeur des titres sériques dépend 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 méthodes différentes ne peuvent donc être comparés directement.
- 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 : 4.7%. La précision intra-essai a été calculée à partir des mesures de 35 et 48 duplicatas lors d'un seul et même essai. Les résultats obtenus sont indiqués en BTU dans la Table 12.

Précision inter-essai : 12.9%. La précision inter-essai a été calculée à partir des résultats de 7 duplicatas lors de 21 essais différents. Les résultats obtenus sont indiqués en BTU dans la Table 13.

Parallélisme/linéarité de dilution : 98.8%. Six échantillons de sérum humain anti-IFN β BAB-positifs contenant différentes concentrations d'anticorps liants anti-IFN β ont été dilués sériellement avec du Tampon d'Incubation et testés selon le protocole standard. Les résultats obtenus sont indiqués en BTU dans la Table 14.

Limite de blanc (LoB) : 5 BTU. Vingt doubles du tampon d'incubation ont été dosés lors d'un seul et même essai. La moyenne et l'écart type des valeurs d'absorbance ont été calculés. La dose minimale détectable d'IFN β BAB a été définie à 4.92 BTU en additionnant 2 écarts types à l'absorbance moyenne du blanc (tampon d'incubation) puis en déterminant le titre correspondant à cette valeur d'absorbance à l'aide de la courbe d'étalonnage obtenue lors du même essai.

Spécificité : Trois types d'expérience ont été menés afin d'évaluer la spécificité du test BÜHLMANN anti-IFN β BAB:

1. Comparaison avec la méthode immunoblot: Treize échantillons de sérum testés par ELISA et présentant des titres élevés d'anticorps anti-IFN β (106 à 784 BTU) ont présenté des valeurs correspondantes d'unités de titrage relatives basses à élevées lorsque analysés par immunoblot. Quatre échantillons présentant des valeurs inférieures à la valeur seuil technique (6 à 35 BTU) de l'ELISA étaient également négatifs avec l'immunoblot.

2. Neutralisation des anticorps anti-IFN β par préincubation avec IFN β : Une forte inhibition concentration-dépendante de la liaison des anticorps anti-IFN β à la microplaque a été observée après que des sérums positifs aux anti-IFN β BAB aient été pré-incubés avec du Tampon d'incubation contenant 0.1 à 10 μ g/ml d'IFN β -1a, IFN β -1b, nhIFN β ou de leurs mélanges. Différentes concentrations (0.1-10 μ g/ml) d'IFN γ n'ont pas eu d'effets remarquables sur la liaison entre la microplaque et les anticorps anti-IFN β des patients atteints de sclérose en plaques traités

3. Spécificité de liaison des anti-IFN β BAB: Des sérums positifs aux anticorps liants anti-IFN β ont été testés dans des microplaques enduites sous conditions identiques mais sans IFN β . Tous les résultats obtenus étaient négatifs ou nettement en-dessous de la valeur seuil technique.

Des sérums contenant différents anticorps pathologiques (par ex. anticorps anti-nucléaire, anti-Ganglioside et anti-MAG) ainsi que des sérums positifs aux immunocomplexes circulants (CIC) ont livré des valeurs (0 à 23 BTU) clairement inférieures à la valeur seuil technique.

Comparaison entre Méthodes : 35 échantillons de sérum provenant de patients traités avec l'IFN β -1a et l'IFN β -1b ont été analysés à l'aide du test BÜHLMANN anti-IFN β BAB ELISA et du Test de Stimulation MxA. La présence d'IFN β induit la synthèse de la protéine antivirale MxA dans les cellules humaines. La neutralisation des anticorps anti-IFN β peut diminuer les effets de l'IFN β et de par ce fait, leur activité spécifique peut être déterminée par la production réduite de MxA (quantification par ELISA). Tous les sérums contenant des anticorps neutralisants ont également été testés positifs avec le test anti-IFN β BAB ELISA. Aucun faux-positif n'a été observé. La valeur seuil employée pour la distinction

positif/négatif était de 50 BTU. Les résultats de la comparaison sont donnés dans la Table 15.

Une deuxième étude avec 242 échantillons de sérum provenant de 39 patients traités avec l'IFN β -1a ou l'IFN β -1b ont été analysés à l'aide du test BÜHLMANN anti-IFN β BAB ELISA et du test de l'effet cytopathique (CPE). La présence d'IFN β protège les cellules humaines de leur lyse induite par des virus. Les anticorps neutralisants anti-IFN β peuvent diminuer l'effet de l'IFN β et leur activité spécifique peut ainsi être déterminée par l'augmentation de la lyse cellulaire (Bertolotto A., communication personnelle). La valeur seuil employée pour la distinction positif/négatif était de 50 BTU. Les résultats de la comparaison sont donnés dans la Table 16.

INTERVALES DES REFERENCES ET VALEURS SEUIL (CUT-OFF)

La fréquence des anticorps liants anti-IFN β (anti-IFN β BAB) dans le sérum humain normal a été déterminée par la mesure d'échantillons de 200 donneurs de sang volontaires asymptomatiques (100 hommes et 100 femmes âgés de 18 à 72 ans) et de 44 patients cliniquement testés positivement pour la sclérose en plaques avant le début de leur traitement à l'IFN β . Tous les échantillons ont été testés selon le protocole standard et les résultats obtenus sont présentés dans la Table 17, exprimés en unités de titrage Bühlmann (BTU).

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

Valeur Seuil Technique : Après l'élimination de 4 valeurs > moyenne + 3 écarts-types, une valeur seuil (moyenne + 3 écarts-types) de 43 BTU a été obtenue. Pour des raisons pratiques, nous recommandons d'utiliser une **valeur seuil théorique de 50 BTU**. De manière similaire, la valeur seuil « moyenne + 3 écarts-types » basée sur les 44 patients cliniquement diagnostiqués avec une sclérose en plaques mais non traités à l'IFN β , a été calculée à 42 BTU, ce qui correspond fortement à celle obtenue pour les donneurs de sang normaux.

Valeur Seuil Clinique : Suivant l'intérêt clinique, nous recommandons d'établir des « valeurs seuil cliniques ». 1) Dans le cas d'une utilisation du test anti-IFN β BAB ELISA dans le but d'une étude (screening) des patients atteints de sclérose en plaques traités à l'IFN β , une valeur seuil clinique à 30 BTU représente le meilleur choix afin d'identifier tous les candidats NAB-positifs potentiels (11). 2) Pour étudier une possible corrélation directe entre le taux de BAB et ses conséquences cliniques, une valeur seuil élevée est recommandée (par ex. 80 BTU ou plus haut). Une étude clinique sur cet aspect est en cours (Pachner *et al.*, US).

USO

Il dosaggio diagnostico *in vitro* BÜHLMANN anti-IFN β ELISA è inteso per la determinazione diretta e quantitativa nel siero umano degli anticorpi IgG anti Interferone- β (IFN β) somministrato terapeutamente.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il siero di pazienti affetti da Sclerosi Multipla (MS) trattati con Interferone- β e con sospetta presenza di anticorpi (Ab) anti sostanza somministrata, i calibratori ed i controlli sono incubati nei pozzetti della micropietra coattati con una miscela di diverse molecole IFN β (IFN β umano naturale, IFN β -1a e IFN β -1b). Dopo rimozione del materiale non trattato attraverso lavaggio, viene aggiunto ai pozzetti un anticorpo anti-IgG umano marcato con perossidasi di rafano (HRP).

Dopo un secondo lavaggio, il Substrato TMB (tetrametilbenzidina) viene aggiunto ai pozzetti con sviluppo della colorazione in ragione del quantitativo di anticorpi leganti anti-IFN β inizialmente legati. La reazione viene terminata aggiungendo la soluzione bloccante e l'assorbimento del colore viene misurato in un lettore di micropietre alla lunghezza d'onda di 450 nm.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropietra Precoattata con -IFN β umano, IFN β -1a ric. & IFN β -1b ric.	12 x 8 Pozzetti	B-IFNB-MP	Lavare due volte prima dell'utilizzo
Foglio sigillante per micropietra	3 fogli		
Tampone di Lavaggio Concentrato (10x) Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-IFNB-WB	Diluire con 900 ml di acqua deionizzata
Tampone di Incubazione Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-IFNB-IB	Pronto all'uso
Calibratori A - D¹⁾ pool di siero umano liofilo contenente anti-IFN β IgG	4 flaconi 1 ml	B-IFNB-CASET	Ricostituire ciascun flacone con 1 ml di Tampone di Incubazione; vortexare
Controllo Basso / Alto²⁾ Siero umano liofilo	2 flaconi 1 ml	B-IFNB-CONSET	Ricostituire ciascun flacone con 1 ml di tampone di Incubazione; vortexare
Marcato Enzimatico IgG anti-umane coniugate con HRP in un tampone a base proteica; conservanti	1 flacone 11 ml	B-IFNB-ELG	Pronto all'uso
Substrato TMB TMB in un tampone citrato con H ₂ O ₂	1 flacone 11 ml	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione Bloccante 0.25 M di acido solforico	1 flacone 11 ml	B-STTS	Pronto all'uso Agente corrosivo

Table 7

¹⁾ I calibratori A, B, C e D contengono rispettivamente 500, 200, 80 e 20 BTU di anticorpi IgG umani anti-IFN β .

²⁾ I Controlli contengono quantitativi lotto-specifici di anticorpi umani anti-IFN β IgG. Fare riferimento al Foglio Aggiuntivo contenente i dati di QC per le concentrazioni reali.

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non utilizzati	
Conservare a 2-8°C. Non utilizzare oltre la data di scadenza	
Reagenti Aperti/ Ricostituiti	
Micropietra	Riporre le strip non utilizzate immediatamente nella busta contenente l'essiccante e risigillarle. Conservare fino alla data di scadenza a 2-8°C.
Tampone di Lavaggio	Conservare fino a 2 mesi a 2-8°C dopo diluizione.
Calibratori	Conservare fino a 2 mesi a -20°C.
Controlli	
Tampone di Incubazione	
Marcato enzimatico	
Substrato TMB	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sulle etichette.
Soluzione Bloccante	Stabile a 18-28°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.

Table 8

PRECAUZIONI

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- La Micropietra (B-IFNB-MP), i Calibratori (B-IFNB-CASET) ed i Controlli (B-IFNB-CONSET) di questo kit 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 di TMB (B-TMB) contiene tetrametilbenzidina, perossido di idrogeno (H₂O₂) e dimetilformamide. La soluzione stoppante (B-STTS) contiene acido solforico (0.25 M). Ciascuno di questi reagenti è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con occhi, pelle e vestiario. Indossare indumenti protettivi, guanti e protezioni per gli occhi. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua.

PRECAUZIONI TECNICHE

- 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).
- 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.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Ricostituire i reagenti liofilizzati secondo le indicazioni. Miscelare bene (agitare in modo vorticoso) i reagenti prima dell'uso.
- I micropozzetti non possono essere riutilizzati.

Procedura del dosaggio ELISA

- Nella procedura del dosaggio ELISA, i **passaggi del lavaggio** sono essenziali per garantire la riproducibilità dei risultati. **Un tempo minimo di incubazione di almeno 20 secondi** del tampone di lavaggio nei pozzetti, deve essere eseguito in ogni passaggio.
- Usando un lavatore automatico, Bühlmann suggerisce vivamente di usare il "PLATE MODE" ossia

erogazione/aspirazione sequenziale su tutte le strip, così che il tempo minimo di incubazione sia garantito.

- **E' importante che il numero di lavaggi consigliato sia rispettato** per assicurare la riproducibilità dei risultati
- Per assicurare la reazione completa tra antigene/ anticorpo, il periodo d'incubazione nel passaggio nr. 5 deve essere di almeno 30 minuti. Un'incubazione più lunga (fino a 5 minuti) non influenza la procedura.
- L'enzima utilizzato per marcare è inattivato con ossigeno ed è altamente sensibile al sodio azide, al thimerosal, all'acido ipocloroso ed ai cloroidrocarburi aromatici spesso riscontrati nelle forniture d'acqua dei laboratori. Quindi, utilizzare solo acqua deionizzata di elevata qualità.
- Si consiglia di dosare calibratori, controlli e campione in duplicato ogni volta che viene eseguito un test. Dal momento che le condizioni variano da saggio a saggio, si deve creare una nuova curva standard ogni volta che viene eseguito un nuovo dosaggio. Si consiglia un allineamento verticale.
- E' considerata la diluizione del campione (1:50) nella specifiche della concentrazione dei Calibratori. Quindi, il quantitativo di BTU presente nel campione non noto può essere direttamente letto attraverso interpolazione con la curva standard.
- Se la concentrazione iniziale di un campione non noto è più elevata del calibratore più alto, il campione di siero deve essere ulteriormente diluito con il Tampone di Incubazione e dosato ancora secondo quanto previsto dalla procedura. Le diluizioni aggiuntive devono essere considerate nel calcolo della concentrazione reale di BTU presente nel campione non noto.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso: 20 µl e 100µl ed 1 ml.
- Provette di polistirene o polipropilene per la preparazione delle diluizioni dei campioni.
- Un cilindro da 1000 ml per la diluizione del tampone di lavaggio concentrato.
- Lavatore di micropiastra o erogatore per il Tampone di Lavaggio.
- Carta blottante.
- Frigorifero.
- Rotatore per micropiastra.
- Lettore per micropiastra per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La procedura richiede 20 µl di siero per la determinazione in duplicato. Prelevare il sangue in provette semplici, evitare l'emolisi, mescolare capovolgendo la provetta diverse volte e lasciare che coaguli per 45 minuti a temperatura ambiente (18-28°C) protetto dalla luce. Centrifugare a 2000 x g per 15 minuti a temperatura ambiente (18-28°C) e prelevare il siero. Non devono essere utilizzati campioni lipemici, emolitici ed itterici. I campioni lipemici possono essere evitati chiedendo ai pazienti di digiunare per almeno 12 ore prima del prelievo. Conservare i campioni di siero a -20°C se non dosati lo stesso giorno. Cicli ripetuti di congelamento e scongelamento dei campioni possono diminuire l'attività anticorpale.

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

1. Diluire tutti i campioni dei pazienti 1:50 con Tampone di Incubazione (e.g. 20 µl di siero + 980 µl di Tampone di Incubazione). Fare in modo che i campioni diluiti rimangano per 30 minuti a 18-28°C prima di dispensarli al punto 4d.

2. Preparare una piastra con strip sufficienti a testare il numero desiderato di Calibratori, Controlli e campioni. Eliminare le strip in eccesso dal supporto e risigillarle **immediatamente** nelle buste di plastica contenenti l'essiccante. Conservarle refrigerate.
3. Lavare le strip coattate due volte utilizzando almeno 300 µl di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e blottare energicamente la piastra su carta assorbente.
- 4a. Dispensare 100 µl of Tampone di Incubazione in duplicato nei pozzetti A1+A2 come bianco reagente.
- 4b. Dispensare 100 µl di Standard A in duplicato nei pozzetti B1+B2.
Dispensare 100 µl di Standard B in duplicato nei pozzetti C1+C2.
Dispensare 100 µl di Standard C in duplicato nei pozzetti D1+D2.
Dispensare 100 µl di Standard D in duplicato nei pozzetti E1+E2.
- 4c. Dispensare 100 µl di Controllo Basso in duplicato nei pozzetti F1+F2.
Dispensare 100 µl di Controllo Alto in duplicato nei pozzetti G1+G2.
- 4d. Dispensare 100 µl di ciascun campione diluito in duplicato nei pozzetti successivi.
5. Coprire la piastra con un foglio sigillante ed incubarla per 2 ore (± 5 minuti) a 2-8°C.
6. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavarli tre volte utilizzando almeno 300 µl/pozzetto (è in più) di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Scuotere la piastra energicamente su carta blottante.
7. Aggiungere 100 µl di Marcato Enzimatico a tutti i pozzetti.
8. Coprire la piastra con un foglio sigillante ed incubarla per 2 ore (± 5 minuti) a 2-8°C.
9. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavarli tre volte utilizzando almeno 300 µl/pozzetto di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Scuotere la piastra energicamente su carta blottante.
Importante: Fare in modo che la Soluzione di Substrato TMB raggiunga 18-28°C prima dell'uso al punto 10.
10. Aggiungere 100 µl di Soluzione di Substrato TMB ad ogni pozzetto.
11. Coprire la piastra con un foglio sigillante, collocare la piastra su un mixer settato a 800-1000 rpm, proteggere la piastra dalla luce diretta ed incubare per 30 minuti (± 5 minuti) a 18-28°C.
12. Aggiungere 100 µl di Soluzione Bloccante per pozzetto. Eliminare le bolle d'aria con un puntale. Procedere con il punto 13 entro 30 minuti.
14. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastra.

CALCOLO DEI RISULTATI

Curva Standard: Annotare l'assorbanza a 450 nm per ciascun calibratore e pozzetto bianco (NSB).

Fare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi (NSB) ed annotare le medie (=assorbanza media corretta). Tracciare i valori dell'assorbanza media corretta (asse verticale) verso le unità titolate (BTU) degli Standard (asse orizzontale) utilizzando carta per grafici lin/log. Tracciare la miglior curva o calcolare la curva standard utilizzando un algoritmo spline smoothed.

Campioni e Controlli: Annotare l'assorbanza a 450 nm per ciascun pozzetto dei campioni e dei controlli. Fare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi ed annotare le medie (= assorbanza media corretta). Collocare il valore dell'assorbanza media corretta dei campioni e dei controlli sull'asse verticale, tracciare una linea

orizzontale che intersechi la curva standard e leggere le unità titolate (BTU) dall'asse orizzontale.

Standardizzazione: Gli standard del kit anti-IFN β BAB ELISA sono calibrati verso un riferimento interno.

Le **Unità Titolate Bühlmann (BTU)** sono stabilite come segue:

- I campioni di donatori normali ed i campioni di donatori MS prima della terapia con IFN β vengono dosati secondo dosaggio anti-IFN β BAB ELISA.
- I campioni diluiti serialmente del pool di riferimento sono dosati nella stessa seduta.

La **diluizione** nella quale ricade il pool di campioni di riferimento vicina al cut-off dei campioni di controllo, citati al punto 1, corrisponde alla titolazione del pool di riferimento, espressa nelle Unità Titolate della Bühlmann (BTU).

NOTA: I valori dei titoli di siero dipendono dal dosaggio e, in particolare, dalla specificità e dai valori di cut-off stabiliti da un dato metodo. I valori del titolo ottenuti da dosaggi diversi non possono essere direttamente comparati.

Typical Data: Vedi Table 11 e Figure 1 per i dati (i risultati e la curva standard). *Questi risultati e la curva standard sono a solo scopo dimostrativo. Occorre generare una curva standard per ogni set di campioni da dosare. Il Controllo di Qualità del Laboratorio BÜHLMANN utilizza una curva spline smoothed.*

CONTROLLO QUALITÀ

Occorre attenersi scrupolosamente a quanto descritto in questa metodica per poter utilizzare al meglio il prodotto. Risultati affidabili potranno essere ottenuti solo utilizzando tecniche di laboratorio precise (attuali linee guida GLP) e seguendo accuratamente le istruzioni per l'utilizzo.

Poiché non esiste in commercio nessun siero di controllo per anti-IFN β -BAB, consigliamo di utilizzare un pool di sieri positivi per il controllo di qualità interno. La riproducibilità dei parametri della curva standard ed i valori dei controlli devono essere entro limiti stabiliti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. I limiti di confidenza per i Controlli BÜHLMANN sono lotto-specifici e stampati sul Foglio Dati del QC aggiunto al kit. La riproducibilità dei parametri della curva standard e dei valori dei controlli devono rientrare nell'ambito di limiti di accettabilità stabiliti dal laboratorio.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude gli errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, controllo della temperatura e dispositivi di rilevazione del tempo ii) settaggio del lettore ELISA, iii) date 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 reagenti forniti con questo kit sono ottimizzati per misurare nel siero umano gli anticorpi diretti verso pazienti cui è stato somministrato Interferone- β .
- Il valore del titolo anticorpale Anti-IFN β deve essere utilizzato come dato aggiuntivo disponibile al medico per monitorare la terapia IFN β .
- I valori del titolo del siero che dipendono dal dosaggio e, in particolare, dalla specificità dei valori di cut-off stabiliti dal dosaggio. I valori del titolo ottenuti con dosaggi diversi non possono essere direttamente comparati.
- I risultati del test vanno interpretati insieme alle informazioni derivanti dagli studi epidemiologici, dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della stessa Seduta): 4.7%. La precisione intra-dosaggio è stata calcolata rispettivamente dai risultati di 35 e 48 coppie di valori in un'unica seduta. I valori sono riportati in Table 12 come Unità Titolate Bühlmann (BTU) di anti-IFN β BAB.

Precisione Inter-Dosaggio (Da una seduta all'altra): 12.9%. La precisione inter-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 7 coppie di valori in 21 sedute diverse. I valori sono riportati in Table 13 come Unità Titolate Bühlmann (BTU) di anti-IFN β BAB.

Linearità di Diluizione/Parallelismo 102.4%. Sei campioni di siero positivo anti-IFN β BAB contenenti diverse concentrazioni di anticorpi leganti IFN β , sono stati diluiti in maniera differenziale con Tampone di Incubazione e dosati secondo procedura. I valori sono riportati in Table 14 come Unità Titolate Bühlmann (BTU) di anti-IFN β BAB.

Limite di Quantification (LoQ): 5 BTU. Venti duplicati del Tampone di Incubazione sono stati dosati in un'unica seduta. La media e la deviazione standard (SD) sono state calcolate per i valori di assorbanza. La dose minima rilevabile di IFN β BAB è stata calcolata in 4.92 BTU, aggiungendo due deviazioni standard all'assorbanza media del bianco reagente (Tampone di Incubazione) ed intersecando questo valore con la curva standard ottenuta nella stessa seduta.

Specificità: Sono stati effettuati tre set di esperimenti per determinare la specificità degli anti-IFN β BAB ELISA:

1. Comparazione con Immunodot Blot: Tredici campioni di pazienti contenenti livelli elevati di anticorpi anti-IFN β (da 106 a 784 BTU) presentavano in un dosaggio Immunodot Blot titoli bassi ed alti corrispondenti alle *Unità di Titolazione Relativa*. Quattro campioni di pazienti hanno presentato risultati al di sotto del cut-off tecnico (da 6 a 35 BTU) ed erano negativi con il dosaggio Immunodot Blot.

2. Neutralizzazione degli anticorpi anti-IFN β BAB attraverso pre-incubazione con IFN β : E' stata osservata una forte inibizione dipendente dalla concentrazione del legame con le micropiastre, quando sieri positivi per l'anti-IFN β BAB sono stati pre-incubati con il Tampone di Incubazione contenente da 0.1 a 10 μ g/ml di IFN β -1a, IFN β -1b, IFN β naturale umano o loro miscele. Le diverse concentrazioni (0.1 – 10 μ g/ml) di IFN γ non hanno presentato effetti sostanziali sul legame degli anticorpi anti-IFN β provenienti da pazienti MS trattati alla micropiastre.

3. Specificità del legame anti-IFN β BAB: Sieri con anti-IFN β BAB positivi sono stati testati su piastre coattate alle stesse condizioni, ma senza IFN β . Tutti i risultati ottenuti erano negativi o significativamente al di sotto del cut-off tecnico. Sieri di pazienti contenenti autoanticorpi patologici diversi (ad es: Anticorpi anti-nucleo, anticorpi anti-ganglioside ed anticorpi anti-MAG) così come sieri positivi agli Immunocomplessi circolanti hanno presentato risultati (da 0 a 23 BTU) significativamente inferiori al cut-off tecnico.

Comparazione di Metodi: 35 campioni di siero di pazienti trattati con IFN β -1a e IFN β -1b sono stati dosati utilizzando, rispettivamente, il dosaggio BÜHLMANN anti-IFN β BAB ELISA ed il Test di Stimulo MxA. La presenza di IFN β induce la sintesi della proteina antivirale MxA nelle cellule umane. Gli anticorpi neutralizzanti anti-IFN β possono diminuire l'effetto dell' IFN β e, quindi, le loro attività specifiche possono essere determinate riducendo la produzione di MxA (quantificazione attraverso ELISA). Tutti i sieri contenenti anticorpi neutralizzanti erano anch'essi positivi con il dosaggio anti-IFN β BAB ELISA. Quindi, non vi erano risultati falsamente positivi. Il cut-off applicato per la discriminazione tra anti-IFN β BAB positivo/ negativo era 50 BTU. I risultati della

USO PREVISTO

El kit de ELISA anti-IFN β de BÜHLMANN esta diseñado para la determinación diagnóstica directa y cuantitativa *in vitro* de anticuerpos IgG a Interferón- β (IFN β) administrado terapéuticamente en suero humano (1-10).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

Se incuba el suero de pacientes de esclerosis múltiple (EM) tratados con interferón- β y sospechoso de contener anticuerpos (Ac) a la sustancia administrada, calibradores y controles en pocillos de microtitulación recubiertos con una mezcla de moléculas de diferentes IFN β (IFN β humano natural, IFN β -1a e IFN β -1b). Después de eliminar el material sin reaccionar mediante un lavado, se añade a los pocillos un anticuerpo a IgG humana marcado con peroxidasa de rábano (HRP).

Después de un segundo paso de lavado se añade a los pocillos el sustrato de TMB (tetrametilbenzidina) y se desarrolla el color en proporción a la cantidad de anticuerpos de unión anti-IFN β unidos en el paso inicial. La reacción finaliza con la adición de una solución de interrupción y se mide la absorbancia del color en un lector de placas de microtitulación a una longitud de onda de 450 nm.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Placa de microtitulación Recubierta con IFN β humano, IFN β -1a rec. y IFN β -1b rec.	12 x 8 pocillos	B-IFNB-MP	Lavar dos veces antes de usar
Sellador de placas	3 unidades		
Tampón de lavado concentrado (10x) con conservantes	1 vial 100 ml	B-IFNB-WB	Diluir con 900 ml de agua desionizada
Tampón de incubación con conservantes	1 vial 100 ml	B-IFNB-IB	Listo para usar
Calibradores A a D¹⁾ Reserva de suero humano liof. que contiene IgG anti-IFN β	4 viales 1 ml	B-IFNB-CASET	Reconstituir cada vial con 1 ml de tampón de incubación, vórtex.
Controles Bajo / Alto²⁾ Suero humano liof.	2 viales 1 ml	B-IFNB-CONSET	Reconstituir cada vial con 1 ml de tampón de incubación, vórtex.
Marcador de enzima Anti-IgG humana conjugado con HRP en un tampón a base de proteínas con conservantes	1 vial 11 ml	B-IFNB-ELG	Listo para usar
Substrato TMB TMB en tampón citrato con H ₂ O ₂	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

Table 9

¹⁾ Los calibradores A, B, C y D contienen 500, 200, 80 y 20 BTU de anticuerpos IgG anti-IFN β humano, respectivamente.

²⁾ Los controles contienen cantidades de anticuerpos IgG anti-IFN β humano específicas del lote. Consulte la hoja de datos de control de calidad adicional para las concentraciones efectivas.

comparazione sono riportati in Table 15 (K.M. Myhr, et al. 1999, Poster at Scand. Neurol. Meeting). Un secondo studio con 242 campioni di siero di 39 pazienti trattati sia con IFN β -1a che con IFN β -1b ha utilizzato rispettivamente il dosaggio BÜHLMANN anti-IFN β BAB ELISA ed il dosaggio ad effetto citopatico (CPE). La presenza di IFN β protegge le cellule umane dalla lisi cellulare mediata da virus. Gli anticorpi neutralizzanti anti-IFN β possono diminuire l'effetto dell' IFN β e, quindi, le loro attività specifiche possono essere determinate da una lisi cellulare aumentata. Il cut-off applicato per la discriminazione anti-IFN β BAB positivo/negativo era 50 BTU. I risultati della comparazione sono riportati in Table 16 (A. Bertolotto, Torino IT, pers. communication).

INTERVALLOS DI REFERENZIA E CUT-OFF

La frequenza degli anticorpi leganti anti-IFN β (anti-IFN β BAB) nel siero umano normale è stata determinata utilizzando campioni di sangue di 200 donatori volontari asintomatici (100 uomini e 100 donne con un'età compresa tra 18 e 72 anni) e da 44 pazienti clinicamente positivi per la Sclerosi Multipla (MS) rispettivamente prima dell'inizio del trattamento con IFN β . Tutti i campioni sono stati dosati secondo procedura e tutti i risultati sono stati ottenuti in Table 17, espressi in Unità Titolate Bühlmann (BTU).

NOTE: Questi intervalli di titolazione devono essere utilizzati solo come linee guida. Si consiglia ad ogni laboratorio di stabilire i propri range attesi rispettivamente per il controllo e per la popolazione di pazienti.

Cut-Off Tecnico Proposto: l'eliminazione dei quattro valori > media + 3 S.D. produrrebbe un valore di cut-off (media + 3 S.D.) di 43 BTU. Per ragioni pratiche, consigliamo di utilizzare un valore di **cut-off teorico di 50 BTU**. In maniera simile, la media + 3 S.D è stata calcolata da 44 pazienti con MS diagnosticata clinicamente, ma non sottoposti a terapia con IFN β , produrrebbe un cut-off teorico di 42 BTU che corrisponde molto da vicino a quello dei donatori normali.

Cut-Off Clinico: In relazione al quesito clinico consigliamo di stabilire i cosiddetti cut-off clinici. 1) Per un utilizzo di screening dell'anti IFN β BAB ELISA in pazienti MS trattati con IFN β un cut-off clinico di 30 BTU è la scelta migliore per trovare virtualmente tutti i candidati potenziali NAB positivi (11). 2) Per studiare una correlazione diretta possibile tra il titolo BAB e le sue conseguenze cliniche, si consiglia un cut-off elevato (es.: 80 BTU o superiore).

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Almacénese a 2-8°C. No utilice el kit pasada la fecha de caducidad.	
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 a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Tampón de lavado	Almacénese hasta 2 meses a 2-8°C después de la dilución.
Calibradores	Almacénese hasta 2 meses a 2-8°C.
Controles	
Tampón de incubación	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas
Marcador de enzima	
Substrato TMB	
Solución de interrupción	Estable a 18-28°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Table 10

PRECAUCIONES

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Las tiras de microtitulación B-IFNB-MP), los calibradores (B-IFNB-CASET) y los controles (B-IFNB-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 substrato y solución de interrupción:** La solución substrato (B-TMB) contiene tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrógeno y dimetilformamida. La solución de interrupción (B-STTS) 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.
- En cuanto a las precauciones adecuadas para la eliminación de los reactivos del kit, recomendamos encarecidamente consultar con anterioridad la normativa local específica de su país.

PRECAUCIONES TÉCNICAS

- 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).
- 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.
- 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.
- Deje atemperar los reactivos hasta que alcancen la temperatura ambiente. Mezcle bien (con agitador de vórtice) los reactivos antes de su uso.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.

Procedimiento de ELISA

- En el procedimiento de ELISA **los pasos de lavado** son esenciales para la garantía de resultados reproductivos. Un **rato mínimo de la incubación por lo menos de 20 segundos** del almacenador intermediario de la colada en los pozos se debe asegurar cada vez.
- Usando una **arandela automatizada**, Bühlmann recomienda fuertemente utilizar un "modo supuesto de la placa" ("plate mode") es decir que cada paso de proceso (dispense/aspiration) se realiza en todas las tiras secuencialmente, antes de procesar al paso de proceso siguiente. Así, el tiempo mínimo de la incubación está garantizado.
- Las repeticiones indicadas del lavado son obligatorias** para asegurar resultados reproductivos.
- Asegurar una interacción completa de antígeno/anticuerpo, **el tiempo de la incubación en el paso 5** no debe ser menos de 30 minutos. Un tiempo moderado más largo de la incubación (hasta a 5 minutos) no tiene ninguna influencia al resultado final.
- La enzima utilizada como marcador se inactiva por oxígeno y es altamente sensible a azida sódica, timerosal, ácido hipocloroso y clorohidrocarburos aromáticos, que se encuentran con frecuencia en los suministros de agua de laboratorio. Por tanto, utilice únicamente agua desionizada de alta calidad.
- La dilución de la muestra (1:50) se tiene en cuenta en la especificación de concentraciones de los calibradores. Por lo tanto, la cantidad de BTU presente en la muestra desconocida puede leerse directamente por interpolación con la curva estándar.
- Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto, la muestra de suero debe diluirse con tampón de incubación y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo. La dilución adicional debe considerarse cuando se calcule la concentración real de BTU presente en la muestra desconocida.
- Se recomienda ensayar calibradores, controles y muestras por duplicado cada vez que se realice una prueba. Puesto que las condiciones varían de ensayo a ensayo, debe generarse una nueva curva estándar cada vez que se realice un nuevo ensayo. Se recomienda la alineación vertical.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables: pipetas de 20 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.
- Papel secante.
- Nevera
- 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 20 µl de suero para la determinación por duplicado. Recoja la sangre en tubos limpios, evite la hemólisis, mezcle girando al revés el tubo de la muestra varias veces y deje coagular durante 45 minutos a temperatura ambiente (18-28°C) protegido de la luz. Centrifugue a 2000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-28°C) y recoja el 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.

Almacene las muestras de suero a -20°C si no va a ser analizada en el mismo día. La congelación y descongelación repetidas de las muestras puede reducir la actividad de los anticuerpos.

ESTANDARIZACIÓN

Los estándares del kit de ELISA de anticuerpos de unión (AcU) anti-IFN β se calibraron contra una referencia interna.

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

- Se ensayaron según el procedimiento del ensayo de ELISA de AcU anti-IFN β muestras de donantes normales, así como muestras de pacientes de EM antes del tratamiento con IFN β (cf. la tabla a continuación).
- Se ensayaron muestras diluidas en serie de la reserva de referencia en la misma prueba.
- La **dilución** en la que la reserva de referencia no alcanza el valor de corte de las muestras de los controles, mencionado en el primer paso, corresponde a la **titulación** de la reserva de referencia, expresada en unidades de titulación Bühlmann (BTU).

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 determinado. Los valores de titulación obtenidos con métodos de ensayo diferentes no pueden compararse directamente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Diluya todas las muestras del paciente 1:50 con el tampón de incubación (p.ej. 20 μl de suero + 980 μl de tampón de incubación). Deje las muestras diluidas en reposo durante 30 minutos a $18-28^{\circ}\text{C}$ antes de pipetear en el paso 4d.
2. Prepare una placa con tiras suficientes para probar el número requerido de calibradores, controles y muestras. Retire las tiras sobrantes del soporte y vuelva a guardarlas en la bolsa de aluminio junto con los sacos desecantes **sin demora**. Almacénelo refrigerado.
3. Lave dos veces las tiras recubiertas 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 como reactivo blanco.
- 4b. 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.
- 4c. 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.
- 4d. Pipetee 100 μl de cada muestra diluida en los pocillos subsiguientes.
5. Cubra con un sellador de placa e incube durante 2 horas (± 5 minutos) a $2-8^{\circ}\text{C}$.
6. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos tres 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 a todos los pocillos.
8. Cubra la placa con un sellador de placa e incube durante 2 horas (± 5 minutos) a $2-8^{\circ}\text{C}$.

9. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos tres 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 $18-28^{\circ}\text{C}$ antes de su uso en el paso 10.

10. Añada 100 μl de la solución sustrato de TMB a cada pocillo.
11. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 800-1000 rpm, protejala placa de la luz directa e incube durante 30 minutos (± 5 minutos) a $18-28^{\circ}\text{C}$.
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.
15. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS Y CÁLCULOS

Curva estándar: Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo del calibrador y blanco (NSB). Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco (NSB) y registre los promedios (= absorbancia media corregida). Represente la absorbancia media corregida (eje vertical) frente a las unidades de titulación Bühlmann (BTU) de los estándares (eje horizontal) utilizando un papel gráfico semilogarítmico. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de ajuste alisado "spline".

Muestras y controles: Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo de las muestras y de los controles. Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida). Localice el valor de la absorbancia media corregida de las muestras y de los controles en el eje vertical, dibuje una línea horizontal que corte la curva estándar y lea las unidades de titulación Bühlmann (BTU) en el eje horizontal.

Datos típicos: Véanse Table 11 y Figure 1 para datos típicos (resultados y curva estándar). *Estos resultados y la curva estándar se ofrecen únicamente con propósitos de demostración. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras que se ensaye. El laboratorio de control de calidad de BÜHLMANN utiliza un ajuste de curva alisado "spline".*

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 estas instrucciones de uso.

Dado que no hay suero de control para AcU anti-IFN β disponible comercialmente, recomendamos el uso de una reserva de suero positivo para los controles de calidad internos. Los límites de confianza para los controles BÜHLMANN son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad adicional.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control 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 substrato con TMB debe ser incolora vi) pureza del agua.

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con este kit están optimizados para medir en suero humano anticuerpos dirigidos contra interferón- β inyectado.
- El valor de titulación de anticuerpos anti-IFN β debe utilizarse como datos suplementarios disponibles para el médico en el control del tratamiento con IFN β .
- 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. Los valores de titulación obtenidos con métodos de ensayo diferentes no pueden compararse directamente.
- 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): 4,7%. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 35 y 48 pares de valores en una única prueba. Los valores se presentan en Table 12 como unidades de titulación Bühlmann (BTU) de AcU anti-IFN β .

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 12,9%. La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 7 pares de valores obtenidos en 21 pruebas diferentes. Los valores se presentan en Table 13 como unidades de titulación Bühlmann (BTU) de AcU anti-IFN β .

Linealidad/paralelismo de dilución: 102,4%. Se diluyeron diferencialmente con tampón de incubación y se ensayaron según el procedimiento del ensayo seis muestras de suero positivas a AcU anti-IFN β que contenían concentraciones diferentes de anticuerpos de unión a IFN β . Los valores se presentan en Table 14 como unidades de titulación Bühlmann (BTU) de AcU anti-IFN β .

Límite para el blanco (LoB): 5 BTU. Se ensayaron veinte duplicados de tampón de incubación en una única prueba. Se calcularon la media y la desviación estándar (DE) de los valores de absorbancia. La dosis mínima detectable de AcU IFN β se calculó en 4,92 BTU añadiendo dos DE a la absorbancia media del reactivo blanco (tampón de incubación) y cortando este valor con la curva estándar obtenida en la misma prueba.

Especificidad: Se realizaron tres conjuntos de experimentos para evaluar la especificidad del ELISA de AcU anti-IFN β :

1. Comparación con inmunotransferencia: Trece muestras de pacientes que contenían titulaciones elevadas de anticuerpos anti-IFN β (106 a 784 BTU) mostraron en una inmunotransferencia *Unidades de Titulación Relativas* correspondientes bajas a altas. Cuatro muestras de pacientes que mostraron resultados por debajo del valor de corte técnico (6 a 35 BTU) también fueron negativas en la inmunotransferencia.

2. Neutralización de AcU anti-IFN β por preincubación con IFN β : Se observó una fuerte inhibición, dependiente de la dosis, de la unión a las placas de microtitulación cuando se preincubaron sueros positivos a AcU anti-IFN β con tampón de incubación que contenía 0,1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de IFN β -1a, IFN β -1b, IFN β humano natural o mezclas de ellos. Diferentes concentraciones (0,1 – 10 $\mu\text{g/ml}$) de INF γ no mostraron efectos sustanciales sobre la unión a la placa de microtitulación de anticuerpos anti-IFN β de pacientes de EM tratados.

3. Especificidad de la unión de AcU anti-IFN β : Se probaron sueros con AcU anti-IFN β positivos en placas recubiertas bajo la misma condición, pero sin INF β . Todos los resultados obtenidos fueron negativos o significativamente inferiores al valor de corte técnico.

Los sueros de pacientes que contenían diferentes autoanticuerpos patológicos (esto es, Ac antinucleares, Ac antigangliósido y Ac antiMAG), así como sueros positivos a complejos inmunocirculantes, mostraron resultados (0 a 23 BTU) significativamente por debajo del valor de corte técnico.

Comparación del método: Se analizaron 35 muestras de suero de pacientes tratados con IFN β -1a y IFN β 1b utilizando el ELISA de AcU anti-IFN β BÜHLMANN y la Prueba de Estimulación de MxA. La presencia de IFN β induce la síntesis de la proteína antivírica MxA en células humanas. Los anticuerpos neutralizantes anti-IFN β pueden reducir el efecto del IFN β y, por tanto, sus actividades específicas pueden determinarse por la producción reducida de MxA (cuantificación por ELISA). Todos los sueros que contenían anticuerpos neutralizantes también fueron positivos en el ELISA de AcU anti-IFN β . No se observaron resultados falsamente negativos. El valor de corte aplicado para la discriminación positiva/negativa a AcU anti-IFN β fue de 50 BTU. Los resultados de la comparación se muestran en **Table 15** (K.M. Myhr et al. 1999, Póster en el Scand. Neurol. Meeting).

En un segundo estudio se analizaron 242 muestras de suero de 39 pacientes tratados con IFN β -1a o IFN β -1b utilizando el ELISA de AcU anti-IFN β BÜHLMANN y el ensayo de efecto citopático (CPE), respectivamente. La presencia de IFN β protege las células humanas de la lisis celular mediada por virus. Los anticuerpos neutralizantes anti-IFN β pueden reducir el efecto del IFN β y, por tanto, sus actividades específicas pueden determinarse por el aumento de la lisis celular. El valor de corte aplicado para la discriminación positiva/negativa a AcU anti-IFN β fue de 50 BTU. Los resultados de la comparación se muestran en Table 16 (A. Bertolotto, Torino IT, comunicación personal).

INTERVALOS DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE

Se determinó la frecuencia de anticuerpos de unión anti-IFN β (AcU anti-IFN β) en suero humano normal usando muestras de sangre de 200 donantes de sangre voluntarios asintomáticos (100 hombres y 100 mujeres de 18 a 72 años) y de 44 pacientes de esclerosis múltiple (EM) clínicamente positivos antes de iniciar tratamiento con IFN β . Todas las muestras se ensayaron según el procedimiento del ensayo y los resultados obtenidos se dan en Table 17, expresados en unidades de titulación Bühlmann (BTU).

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

Valor de corte técnico propuesto: La eliminación de los cuatro valores $>$ media + 3 DE daría como resultado un valor de corte (media + 3 DE) de 43 BTU. Por razones prácticas recomendamos utilizar un **valor de corte teórico de 50 BTU**. De manera similar, el valor de la media + 3 DE calculado a partir de 44 pacientes diagnosticados clínicamente de EM, pero sin terapia de IFN β , produciría un valor de corte teórico de 42 BTU, que se corresponde estrechamente con el de los donantes de sangre normales.

Valor de corte clínico: Recomendamos establecer los denominados valores de corte según la pregunta clínica. 1) Para una aplicación del ELISA de AcU anti-IFN β como técnica de detección en pacientes de EM tratados con IFN β un valor de corte clínico de 30 BTU es la mejor opción para

encontrar virtualmente todos los posibles candidatos positivos a AcU (11). 2) Para estudiar una posible correlación directa entre la titulación de AcU y sus consecuencia clínicas se

recomienda un valor de corte elevado (p.ej. 80 BTU o superior).

APPENDIX I

REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ REFERENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

1. Hall GL, et al.: *Beta-interferon and multiple sclerosis*. Trends Neurosci **20**, 63-67 (1997).
2. Chofflon M: *Recombinant human interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis: a review of the major clinical trials*. Eur J Neurol **7**, 369-380 (2000).
3. Vallbracht A, et al.: *Interferon-neutralizing antibodies in a patient treated with human fibroblast interferon*. Nature **289**, 496-497 (1981).
4. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group: *Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b*. Neurology **47**, 889-894 (1996).
5. Antonelli G, Dianzani F: *Development of antibodies to interferon beta in patients: technical and biological aspects*. Eur Cytokine Netw **10**, 413-422 (1999).
6. Pachner AR: *Anticytokine antibodies in beta interferon-treated MS patients and the need for testing: Plight of the practicing neurologist*. Neurology **49**, 647-650 (1997).
7. Medenica RD, et al.: *Interferon inhibitor factor predicting success of plasmapheresis in patients with multiple sclerosis*. J Clin Apheresis **9**, 216 (1994).
8. Deisenhammer F, et al. : *Bioavailability of interferon beta 1b in MS patients with and without neutralizing antibodies*. Neurology **52**, 1239-1243 (1999).
9. Paty DW, et al.: *Guidelines for physicians with patients on IFN β -1b: The use of an assay for neutralizing antibodies (NAB)*. Neurology **47**, 865-866 (1996).
10. Havredaki M, Barona F: *Variations of interferon activators and/or inhibitors in human serum and their relationship to interferon therapy*. Jpn J Med Sci Biol **38**, 107 (1985).
11. Pachner et al.: *Antibodies to IFN- β in multiple sclerosis patients: measurement by a commercially available kit*. Proceedings, 125th Annual Meeting, American Neurological Association, October 2000, Boston, MA, Abstract #230.

Table 11: **Example of Typical Data**

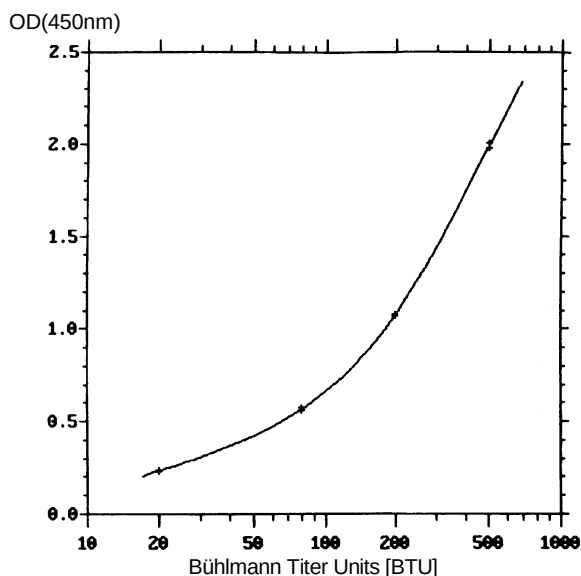
	Conc. (BTU)	Absorbance (OD)	Calc. Conc. (BTU)	CV Conc. (%)
Blank		0.085		
Blank		0.086		
Blank Avg.		0.086		
Std. A	500	1.978	494	
Std. A	500	2.006	506	
Std. A Avg.	500	1.993	500	1.8
Std. B	200	1.072	199	
Std. B	200	1.077	201	
Std. B Avg.	200	1.075	200	0.4
Std. C	80	0.560	78	
Std. C	80	0.577	82	
Std. C Avg.	80	0.569	80	3.3
Std. D	20	0.235	20	
Std. D	20	0.233	20	
Std. D Avg.	20	0.234	20	0.8
Ctrl. LOW		0.573	81	
Ctrl. LOW		0.573	81	
Ctrl. L. Avg.		0.573	81	0.0
Ctrl. HIGH		1.163	222	
Ctrl. HIGH		1.170	224	
Ctrl. H. Avg.		1.166	223	0.6
Sample 1		0.112	<20	
Sample 1		0.108	<20	
Sam. 1 Avg.		0.110	<20	1.6
Sample 2		1.444	300	
Sample 2		1.467	307	
Sam. 2 Avg.		1.455	303	1.6

Table 12: **Intra-Assay Precision (Within-Run)**

Sample diluted 1:50	Pairs [n]	Mean [BTU]	SD [BTU]	CV [%]
serum 1	35	63	3.5	5.6
serum 2	48	122	4.2	3.4
serum 3	48	172	8.6	5.0
Mean				4.7

Table 13: **Inter-Assay Precision (Run-to-Run)**

Sample diluted 1:50	Mean [BTU]	SD [BTU]	CV [%]
serum 4	10	1.7	16.4
serum 5	11	1.3	11.1
serum 6	36	3.3	12.0
serum 7	57	5.9	10.8
serum 8	89	14.2	15.9
serum 9	146	16.4	12.1
serum 10	205	22.1	11.9
Mean			12.9

Figure 1: **Example of a Standard Curve**Table 14: **Dilution Linearity/Paralellism**

Sample	Dilution Factor	Observed [BTU]	Expected [BTU]	Recovery O/E [%]
serum 11	1: 50	349	--	--
	1:100	195	175	112
	1:200	92	87	105
	1:400	42	44	96
serum 12	1: 50	306	--	--
	1:100	154	153	101
	1:200	68	77	89
	1:400	30	38	78
serum 13	1: 50	202	--	--
	1:100	100	101	99
	1:200	44	51	87
	1:400	22	25	87
serum 14	1: 50	154	--	--
	1:100	79	77	103
	1:200	35	39	91
	1:400	18	19	94
serum 15	1: 50	84	--	--
	1:100	55	42	130
	1:200	30	21	143
	1:400	18	10	168
serum 16	1: 50	65	--	--
	1:100	28	32	87
	1:200	15	16	92
	1:400	7	8	82
Mean				102.4

Table 15: **Method Comparison vs. MxA Stimulation**

n=35		anti-IFN β BAB ELISA	
		+	-
MxA Assay	+	5	0
	-	4	26

Table 16: **Method Comparison vs. CPE Test**

n=242		anti-IFN β BAB ELISA	
		+	-
CPE Assay	+	61	6
	-	73	102

Table 17: **Expected Values**

	Normal Donors	MS patients before IFN β treatment
Total [n]	200	44
Range of Values [BTU]	3-81	3-73
S.D. [BTU]	12	11
Mean Value [BTU]	15	9
Median Value [BTU]	11	6
Mean + 3 S.D. [BTU]	52	42
n > Mean + 3 S.D.	4	1

Table description: cf. “Results and Calculation”, “Performance Characteristics” and “Expected Values and Cut-off”

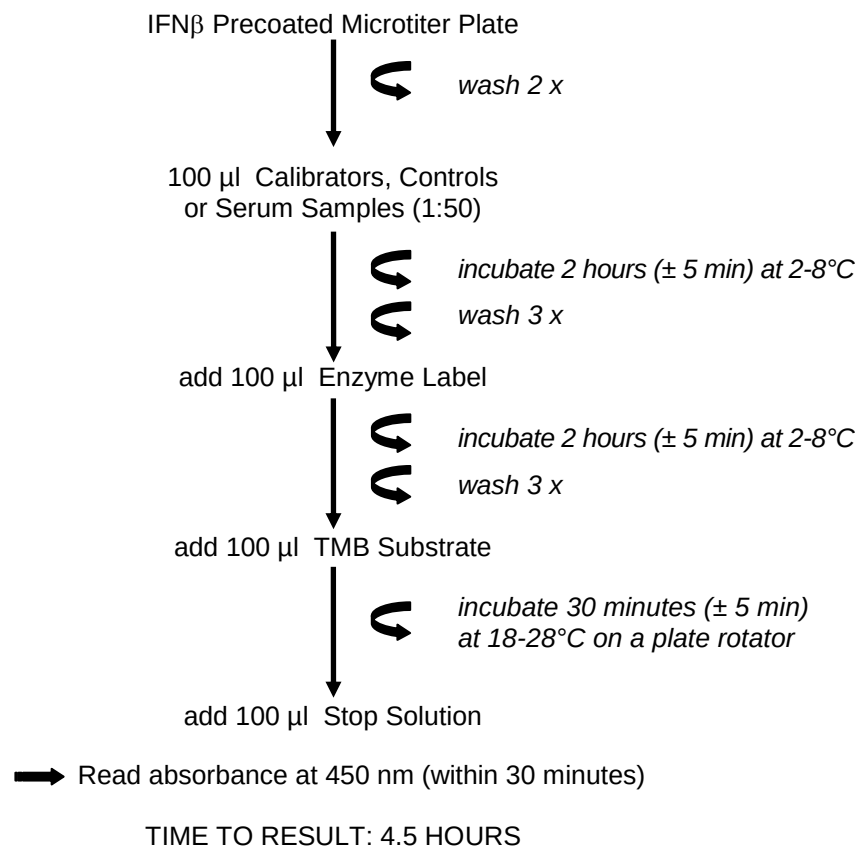
Tabellenbeschreibung: siehe “Resultate”, “Leistungsmerkmale” und “Normalbereich und Grenzwert”

Explications relatives aux Tableaux: voir « Resultats » et « Caractéristiques de Performance » et « Valeur Seuil »

Descrizione tavola: cf. “Calcolo dei Risultati” e “Caratteristiche del dosaggio” e “Valori attesi e Cut-off”

Explicaciones relativas a las tablas: ver “Resultados y Cálculos”, “Características de Eficiencia” y “Valores esperados”

anti-IFN β BAB ELISA



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	Microtiterplate Mikrotiter-Platte Microplaque Micropiastra Microplaca

Symbol	Explanation
BUF WASH 10X	Wash Bufer Concentrate (10x) Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (x10)
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone d'incubazione Tampón de incubación
CAL A - CAL D	Calibrator A - D Kalibrator A - D Calibrateur A - D Calibratore A - D Calibrador A - D
CONTROL L	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
CONTROL H	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
EL	Enzyme Label Enzym-Marker Marqueur enzymatique Marcato enzimatico Marcador enzimático
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



Reg. Nr. 22176



Printing Date
2013-01-30