



anti-MAG

anti-Myelin Associated Glycoprotein Autoantibodies ELISA

EK-MAG 96 tests

Revision date: 2012-11-16

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN anti-MAG ELISA is intended for the quantitative *in vitro* diagnostic determination of human IgM-autoantibodies directed against Myelin Associated Glycoprotein (MAG) (1, 2).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The anti-MAG autoantibodies ELISA employs the quantitative enzymatically amplified sandwich-type immunoassay technique. HIGHLY PURIFIED MAG FROM HUMAN BRAIN (2) has been precoated onto a microtiter plate. Calibrators and patient sera are incubated for two hours in the microtiter wells and any anti-MAG autoantibodies present are bound by the immobilized human MAG. After washing away any unbound substances, horseradish peroxidase (HRP) labeled antibodies against human IgM are added to the wells and incubated for another two hours. After a wash step, the substrate solution containing tetramethylbenzidine (TMB) is added to the wells and incubated for 30 minutes. A blue coloration develops in proportion to the amount of anti-MAG autoantibodies bound in the initial step. The color development is stopped by adding an acidic stop solution (H₂SO₄) which turns the blue solution to yellow. The intensity of the color absorbance is measured in a microtiter plate reader at a wavelength of 450 nm. The absorbance measured is directly proportional to the concentration of anti-human MAG autoantibodies. A set of human anti-MAG autoantibody calibrators is used to plot a standard curve of absorbance versus human anti-MAG autoantibody titer units from which the concentrations of anti-human MAG autoantibodies in the unknowns can be calculated.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Microtiter Plate 96 wells precoated with human MAG	12 x 8-well strips with holder	B-MAG-MP	Ready to use
Plate Sealer	3 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10x)	1 bottle 100 ml	B-MAG-WB	Dilute with 900 ml of deionized water
Incubation Buffer with preservatives	1 bottle 100 ml	B-MAG-IB	Ready to use
Calibrators A to D¹ Human serum with preservatives	4 vials	B-MAG-CASET	Add 1 ml of Incubation Buffer
Low and High Control² Human serum with preservatives	2 vials	B-MAG-CONSET	Add 1 ml of Incubation Buffer
Enzyme Label IgM Anti-human IgM antibody conjugated to HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 ml	B-MAG-ELM	Ready to use Blue solution
TMB Substrate TMB in Citrate buffer with Hydrogen Peroxide	1 vial 11 ml	B-TMB	Ready to use
Stop Solution 0.25 M Sulfuric acid	1 vial 11 ml	B- STS	Ready to use Corrosive agent

Table 1

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

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

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Store at 2-8°C. Do not use past kit expiration date printed on the label.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Microtiter Plate	Return unused strips immediately to the foil pouch containing the desiccant packs and reseal along the entire edge of zip-seal. Store for up to 2 months at 2-8°C.
Wash Buffer diluted	Store for up to 2 months at 2-8°C.
Calibrators	Store for up to 2 months at -20°C.
Controls	
Incubation Buffer	Store at 2-8°C until expiration date.
Enzyme Label IgM	
TMB Substrate (protect from light)	
Stop Solution	Store at 18-28°C until expiration date.

Table 2

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- Both, Calibrator (B-MAG-CASET) and Controls (B-MAG-CONSET) of this kit contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions.
- Substrate and Stop Solution:** The Substrate Solution (B-TMB) contains Tetramethylbenzidine (TMB), hydrogen peroxide and dimethylformamide. The Stop Solution (B-STS) contains sulfuric acid. Each of those reagents is irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothing. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.
- Unused solution should be disposed of according to local State and Federal regulations.

TECHNICAL PRECAUTIONS

Kit components

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use:
- Residues in the microtiter plate** wells result from the production process. They are removed in the washing step (Assay procedure step 3) and do not affect the results.
- Steps 3-9:** Use cold (2-8°C) reagents for all these steps and keep them cold while pipetting.
- Steps 3, 6, 9:** Make sure that the wells are completely empty after the last washing cycle.
- Step 9:** Adjust TMB Substrate to room temperature (18-28°C) before using it.
- Step 11:** Shake microtiter plates during the incubation with substrate. Depending on the plate shaker, we recommend 400-600 rpm. The solution should be moved in the wells but must not spill over.
- If an **automated washer is used**, "plate mode" should be chosen so that dispensing is performed sequentially on all strips before aspirating.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.

- Do not mix different lots of reagents.
- Every effort should be made to ensure that no cross contamination occurs between reagents, samples or between wells.
- Microwells cannot be re-used.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The procedure calls for <0.1 ml of blood or <50 µl of serum. Lipemic, hemolytic and icteric samples should not be used in this assay. Lipemic samples can be avoided by asking patients to fast for at least 12 hours prior to the sample being taken. Collect blood into plain tubes, avoid hemolysis, leave to clot for one hour at RT (18-28°C), centrifuge for 15 minutes at approximately 1800 x g at RT and collect the serum.

Store serum samples at ≤-20°C. Samples are stable for ≥1 year if stored at ≤-20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Frozen samples should be thawed and mixed thoroughly by gentle swirling or inversion prior to use.

ASSAY PROCEDURE

1. Dilute all patient samples 1:1000 with Incubation Buffer (e.g. 2 µl of serum + 2 ml of Incubation Buffer). Allow diluted samples to set for one hour at 18-28°C vortex from time to time. Put samples for 10 minutes on ice prior to pipetting in step 4c.
2. Prepare a plate with sufficient strips to test the desired number of calibrators, controls and samples. Remove excess strips from the holder and reseal them in the foil pouch together with the desiccant packs **without delay**. Store refrigerated.

Important: Use refrigerated reagent solutions in steps 3. to 9.

3. Wash the coated wells four times using at least 300 µl of refrigerated Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
- 4a. Pipet 100 µl of Incubation Buffer (as blank) in duplicate into wells A1+A2.
Pipet 100 µl of Calibrator A in duplicate into wells B1+B2.
Pipet 100 µl of Calibrator B in duplicate into wells C1+C2.
Pipet 100 µl of Calibrator C in duplicate into wells D1+D2.
Pipet 100 µl of Calibrator D in duplicate into wells E1+E2.
- 4b. Pipet 100 µl of the Low Control in duplicate into wells F1+F2.
Pipet 100 µl of the High Control in duplicate into wells G1+G2.
- 4c. Pipet 100 µl of each diluted sample in duplicate into the subsequent wells.
5. Cover the plate with a Plate Sealer and incubate for 2 hours (± 5 min) at 2-8°C.

6. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and wash four times using at least 300 µl of **refrigerated** Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
7. Add 100 µl of Enzyme Label IgM to all wells.
8. Cover the plate with a Plate Sealer and incubate for 2 hours (± 5 min) at 2-8°C.
9. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and wash four times using at least 300 µl of **refrigerated** Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.

Important: Allow TMB substrate solution to reach 18-28°C.

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 min) at 18-28°C.
12. Add 100 µl of Stop Solution to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 13. within 30 minutes.
13. Read the absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader. If wavelength correction is available, set instrument to dual wavelength measurement at 450 nm with background wavelength correction set at 600 or 620 nm.

STANDARDIZATION

The Calibrators included in this kit has been calibrated against internal reference pool. The reference pool consists of more than 10 human sera containing low, medium and high titers of anti-MAG antibodies, respectively. Titers and specificity of each serum in the reference pool were first analyzed by anti-MAG immunoblots.

The **Bühlmann Titer Units (BTU)** were established as follows:

- Normal donor samples were assayed according to the anti-MAG ELISA assay procedure.
 - Serially diluted samples of the Reference Pool were assayed in the same run.
 - The dilution at which the Reference Pool sample falls short of the cut-off corresponds to the titer of the reference pool.
- NOTE: Serum titer values depend on the assay method and, in particular, on the specificity and the cut-off values established with an individual assay method. Therefore, titer values obtained with different methods cannot be compared directly.

RESULTS AND CALCULATION

Standard Curve

- Record the absorbance at 450 nm for each calibrator.
- Average the duplicate values.
- Plot the average absorbance values (vertical y-axis) versus BTU (see next chapter) of the calibrators (horizontal x-axis) using a lin/log graph paper.
- Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a spline smoothed fitting algorithm.

Samples and Controls

- Record the absorbance at 450 nm for each sample and control well.
- Average the duplicate values.
- Locate the absorbance values of the samples and controls on the vertical axis, draw a horizontal line intersecting the standard curve and read from the horizontal axis.

NOTE: If the microtiter plate reader is not capable of reading absorbance greater than 2 or greater than the absorbance of the highest calibrator (Calibrator A), a second reading at a wavelength of 490 or 492 nm is recommended (reference filter at 600 or 620 nm if available). In this case, proceed to

construct a second standard curve with the absorbance readings of all calibrators at 490 or 492 nm. The concentration of the off-scale samples at 450 nm are then read from the new standard curve as described above. The readings at 490 or 492 nm should not replace the on-scale readings at 450 nm.

Note: The results presented in Table 11 and Figure 1 are examples. Calibrator and Controls must be used in each individual assay.

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.

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this package insert 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 package insert.

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

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

The reproducibility of 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.

PERFORMANCE LIMITATIONS

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision (Within-Run): 6.5%. The intra-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values obtained in a single run (cf. Table 13).

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 15.4%. The inter-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values obtained in 20 different runs (cf. Table 14).

Dilution Linearity/Parallelism: 147%. 7 human serum samples containing high titer of anti-MAG antibodies were diluted with Incubation Buffer 1:1000 to 1:64000, left for one hour at 18-28°C and subsequently assayed according to the assay procedure (cf. Table 15). It is suggested that the relatively high deviation in about 50% of the samples is due to antibody aggregations. In general, pathological sera show strongly elevated titer of autoantibodies therefore it has no influence to the positive/negative discrimination.

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

Functional sensitivity: 900 BTU. 20 duplicates of low titer anti-MAG autoantibodies were assayed in a single run.

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

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

1. **NEUTRALIZATION OF ANTI-MAG AUTOANTIBODIES:** Five sera with high anti-MAG titers could be inhibited from binding to the microtiter plates coated with MAG in a concentration-dependent manner when preincubated for one hour with Incubation Buffer supplemented with 1 to 200µg/ml of MAG prior to testing in the ELISA.

2. **SPECIFICITY OF ANTI-MAG AUTOANTIBODY BINDING:** Five sera with medium to high anti-MAG autoantibody titers and five negative sera were tested on a GanglioCombi (EK-GCO) plate coated with asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b. None of the sample showed ratio higher than 10% (Cut-off ratio >12%). Similarly, six sera with high anti-Ganglioside autoantibody titers (see above) and five negative sera, were tested on plates coated with MAG. None of these disease state sera gave a signal higher than 300 BTU.

3. **COMPARISON TO IMMUNOBLOT (WESTERN BLOT):** 127 patient sera (40 female; 87 male; age 4-90 years) with neurological diseases suspectedly caused by anti-MAG autoantibodies were tested by the ELISA and a western blot method, respectively. MAG isolated from human central nervous system (CNS) was used in both methods. All 12 sera showing medium to very high titers of anti-MAG IgM autoantibodies in the ELISA procedure were also clearly positive when analyzed on immunoblots. 114 out of 115 sera showing anti-MAG IgM antibody titers below the ELISA cut-off value were also negative when analyzed on immunoblots, whereas 1 serum was slightly positive by the immunoblot method only (F. Ferracin and A.J. Steck, unpublished results).

4. **COMPARISON TO INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY (IFA):** Sera from 150 patients (unknown sex and age) diagnosed as having IgM monoclonal gammopathies were tested by the ELISA and an IFA method, respectively. In the IFA method, sera were incubated on frozen and acetone-fixed monkey sciatic nerve sections and bound anti-MAG antibodies were detected by FITC-labeled anti-human IgM antibody. 26 patients (17.3%) were positive and 115 patients (76.7%) were negative in both methods, whereas 5 sera (3.3%) were positive in the IFA method only and 4 sera (2.7%) were only positive in the ELISA method, respectively (3).

REFERENCE INTERVALS AND CUT-OFF

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

Table 12 were obtained.

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

Proposed Cut-off Titer

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

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN anti-MAG ELISA wird gebraucht für die direkte und quantitative *in vitro* diagnostische Bestimmung von IgM-Autoantikörpern gegen das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG)(1,2).

PRINZIP DER METHODE

Der vorliegende anti-MAG Autoantikörper ELISA Test ist ein immunometrischer Festphasen-Enzymimmunoassay. Die Mikrotiter-Platte ist mit HOCHGEREINIGTEM HUMANEM MAG Antigen beschichtet mit höchster Spezifität und Sensitivität. Standards, Kontrolle und Patientenproben werden in die Antigen beschichtete Mikrotiter-Platte pipettiert. In der Probe vorhandene Autoantikörper binden während der ersten 2-stündigen Inkubation (2-8°C) an das in der Mikrotiter-Platte immobilisierte MAG. Nicht gebundene Serumkomponenten werden durch einen Waschschrift entfernt. Anschliessend wird ein, gegen die nachzuweisenden Autoantikörper gerichtetes, Anti-human-IgM-Meerrettichperoxidase (anti-IgM-HRP) Konjugat in die Mikroküvetten der Mikrotiter-Platten pipettiert. An die immobilisierten Antigene gebundene Autoantikörper werden während der folgenden 2-stündigen Inkubation (2-8°C) von diesem enzymmarkierten Tracer-Antikörpern spezifisch erkannt und durch Ausbildung eines Sandwich-Komplexes markiert. Ungebundenes Enzymkonjugat wird durch erneutes Waschen eliminiert. Das zugegebene Substrat, Tetramethylbenzidin (TMB) wird anschliessend vom gebundenen Enzym zu einem blauen Endprodukt umgesetzt. Die Enzymreaktion wird nach 30 Minuten durch Zugabe einer sauren Stop-Lösung (H₂SO₄) beendet, welche die Färbung nach gelb umschlagen lässt. Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung ist der Konzentration Autoantikörper in den Proben direkt proportional. Ein Set von human anti-MAG Autoantikörper Kalibratoren wird gebraucht um eine Standardkurve zu erstellen. Daraus lässt sich die Antikörper Konzentration aus einer unbekannten Probe berechnen.

GELIEFERTE REAGENZEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Mikrotiter-Platte beschichtet mit humanem MAG	8 x 12 Micro- küvetten mit Halter	B-MAG-MP	gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Stück		
Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Konservierungsstoffe	1 Flasche 100 ml	B-MAG-WB	mit 900 ml deionisiertem H ₂ O verdünnen
Inkubations-Puffer Konservierungsstoffe	1 Flasche 100 ml	B-MAG-IB	gebrauchsfertig
Kalibrator A-D¹ Humanserum; Konservierungsstoffe	4 Flaschen	B-MAG-CASET	mit 1 ml Inkubations- Puffer versetzen
Kontrolle tief und hoch² Humanserum Konservierungsstoffe	2 Flaschen	B-MAG-CONSET	mit 1 ml Inkubations- Puffer versetzen
Enzymmarker IgM Anti-IgM-HRP in einem Protein-basierten Puffer Konservierungsstoffe	1 Flasche 11 ml	B-MAG-ELM	gebrauchsfertig blaue Lösung
TMB-Substrat in Zitrat-gepufferter H ₂ O ₂ Lösung	1 Flasche 11 ml	B-TMB	gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M H ₂ SO ₄	1 Flasche 11 ml	B-STs	gebrauchsfertig korrosiv!

Table 3

¹ Nach der Rekonstitution enthalten die Kalibratoren A, B, C und D 70000, 15000, 3000 und 1000 Bühlmann Titer Unit (BTU) anti-MAG Antikörper.

² Kontrollen enthalten lot-spezifische anti-MAG Antikörper Mengen. Für Konzentrationsangaben siehe beigelegtes Kontrolldatenblatt.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Zu verwenden bis zum Verfallsdatum, angegeben auf der Packungsetikette. Lagerung bei 2-8°C.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Microtiter-Platte	Ungebrauchte Streifen sofort in die mit Dessikator versetzte Packung zurückbringen. Packung völlig schliessen. Bis zu 2 Monate bei 2-8°C haltbar.
Wasch-Puffer (verdünnt)	Zu verwenden bis 2 Monate nach Rekonstitution. Bei 2-8°C lagern.
Kalibratoren Kontrollen	Zu verwenden bis 2 Monate nach Rekonstitution. Bei -20°C lagern.
Inkubations-Puffer	Zu verwenden bis zum Verfallsdatum. Bei 2-8°C lagern.
Enzymmarker IgM	
TMB Substrat (vor Licht schützen)	
Stopp-Lösung	Zu verwenden bis zum Verfallsdatum. Bei 18-28°C lagern.

Table 4

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Die Kalibratoren (B-MAG-CASET) und Kontrollen (B-MAG-CONSET) enthalten Komponenten menschlicher Herkunft. 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-STTS) enthält Schwefelsäure. Jeder dieser Reagenzien reizt die Augen, die Haut und die Schleimhautmembranen. Berührung mit den Augen, der Haut und die Bekleidung vermeiden. Nach Berührung sofort mit viel Wasser spülen.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss der gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negative beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Auf Grund des Produktionsprozesses kann es **Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten** haben. Sie werden mit dem 1. Waschen (Schritt 3) entfernt und haben keinen Einfluß auf die Ergebnisse.
- Schritt 3-9: Auf 2-8°C gekühlte Reagenzien sollen in allen diesen Schritten verwendet werden und sie sollen während des Pipettierens kalt gehalten werden.
- Schritte 3, 6, 9: Die Kavitäten müssen nach dem letzten Waschzyklus vollständig entleert werden.
- Schritt 9: Das verwendete TMB Substrat muss auf Raumtemperatur (18-28°C) gebracht werden.
- Schritt 11: Während der Substratinkubation muss die Platte geschüttelt werden. Die angegebenen rpm (400-600) können nicht direkt auf jeden Schüttler übertragen werden. Die Lösung in den Kavitäten soll in Bewegung gebracht werden, darf aber nicht überschwappen.
- Wird ein Waschautomat eingesetzt, soll der sogenannte „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass das Einfüllen des Waschpuffers erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor das Absaugen gestartet wird.

- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kit Lots.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu einer Kontamination zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und zwischen den Wells kommt.
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Dieser Test benötigt <0.1 ml Blut oder <20 µl Serum. Lipämische, hämolytische oder ikterische Blutproben sollten nicht verwendet werden. Lipämische Proben können verhindert werden, indem der Patient mindestens 12 Stunden vor der Blutentnahme keine Nahrung zu sich nimmt. Die Blutproben in den entsprechenden Röhrchen sammeln, Hämolyse vermeiden, eine Stunde lang bei RT (18-28°C) gerinnen lassen, 15 Minuten lang bei RT und 1800 x g zentrifugieren, danach Serum sammeln. Serumproben bei ≤-20°C lagern. Die Proben sind ≥ 1 Jahr haltbar, wenn sie bei ≤-20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Gefrorene Proben vor dem Gebrauch auftauen und durch leichtes Rühren gut mischen.

ARBEITSANLEITUNG

- Patientenproben mit Inkubationspuffer 1:1000 verdünnen (z.B. 2 µl Serum + 2 ml Inkubations-Puffer). Verdünnte Proben eine Stunde lang bei 18-28°C stehen lassen (gelegentlich Vortexen) und anschliessend vor dem Pipettierschritt 4c, die Proben 10 Minuten lang auf Eis inkubieren.
- Eine Mikrotiter-Platte mit ausreichend Streifen für das Testen der gewünschten Kalibratoren, Kontrollen und Proben vorbereiten. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und sofort mit dem Dessikator einpacken und gekühlt lagern.

Wichtig: In den Schritten 3 bis 9 gekühlte (2-8°C) Lösungen brauchen.

- Mikroküvetten viermal mit jeweils ≥300 µl kaltem Waschpuffer waschen. Waschpuffer dekantieren und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
- 4a. Zweimal 100 µl Inkubations-Puffer in die Mikroküvetten A1 und A2 pipettieren (Blank). Zweimal 100 µl Kalibrator A in die Mikroküvetten B1 und B2 pipettieren. Zweimal 100 µl Kalibrator B in die Mikroküvetten C1 und C2 pipettieren. Zweimal 100 µl Kalibrator C in die Mikroküvetten D1 und D2 pipettieren. Zweimal 100 µl Kalibrator D in die Mikroküvetten E1 und E2 pipettieren.
- 4b. Zweimal 100 µl Kontrolle TIEF in die Mikroküvetten F1 und F2 pipettieren.

Zweimal 100 µl Kontrolle HOCH in die Mikroküvetten G1 und G2 pipettieren.

4c. Zweimal 100 µl von den 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 und die Mikroküvetten entleeren und viermal mit jeweils ≥300 µl **kaltem** Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

7. 100 µl Enzymmarker IgM zu jeder Mikroküvette zugeben.

8. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden (± 5 Minuten) bei 2-8°C inkubieren.

9. Abdeckfolie entsorgen und die Mikroküvetten entleeren und viermal mit jeweils ≥300 µl **kaltem** Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

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

10. 100 µl TMB-Substrat zu jeder Mikroküvette zugeben.

11. Mikrotiter-Platte mit Abdeckfolie abdecken und 30 Minuten (± 5 Minuten) bei 18-28°C auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler (800-1000 rpm) inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.

12. 100 µl Stopp-Lösung zu jeder Mikroküvette zugeben und allfällige Luftbläschen mit Pipettenspitzen entfernen.

13. Optische Dichte bei 450 nm innerhalb der nächsten 30 Minuten messen. Bi-chromatische Messung mit einer Referenzfilterwellenlänge im Bereich von 600-620 nm ist empfehlenswert.

STANDARDISIERUNG

Die Kalibratoren wurden gegen ein internes Referenzpool (> zehn individuelle Humansenen mit niedrigem, mittlerem und hohem Anti-MAG Autoantikörper-Titer) kalibriert. Die Spezifität und der Autoantikörpergehalt dieser Proben, wurde zuvor mittels eines Anti-MAG Immunoblots charakterisiert.

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

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

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

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Eichkurve

- Absorption bei 450 nm von jedem Kalibrator aufschreiben.
- Mittelwerte der Doppelbestimmung der gemessenen Kalibrator-Absorptionen berechnen.
- Auf halblogarithmischem Papier, die Absorptions-Mittelwerte der Kalibratoren (Y-Achse/linear) gegen die in BTU (siehe unten) gegebenen Konzentrationen (X-Achse/logarithmisch) auftragen.

- Eichkurve zeichnen oder die entsprechende geglättete Spline-Funktion mit einem „spline smoothed fitting“ Algorithmus berechnen.

Proben und Kontrollen

- Absorption bei 450 nm jeder Probe und Kontrollen aufschreiben.
- Mittelwerte der Doppelbestimmungen berechnen.
- Konzentration der unbekannten Proben durch Interpolation aus der Eichkurve bestimmen.

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

Table 11 sowie Figure 1 zeigen typische Messwerte für diesen Kit. Die Daten dienen nur als Beispiel. Die Absorptionswerte des Kalibrators und der Kontrollen müssen bei jeder Testdurchführung neu ermittelt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

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

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

EINSCHRÄNKUNGEN DER LEISTUNGSMERKMALE

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

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision (Within-Run): 6.5%. Die intra-assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung im gleichen Ansatz (siehe Table 13).

Inter-Assay Präzision (Run-to-Run): 15.4%. Die inter-assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung in 20 verschiedenen Ansätzen (siehe Table 14).

Verdünnungslinearität: 147%. Sieben Serumproben mit erhöhten anti-MAG Autoantikörper Titer wurden mit Inkubations-Puffer 1:1000 bis 1:64000 verdünnt, für eine Stunde bei 18-28°C stehen gelassen und danach

entsprechend der Arbeitsanleitung getestet (siehe Table 15). Es wird vermutet, dass die relativ hohen Abweichungen, in ungefähr 50% der Proben, aufgrund von Antikörper Aggregaten zustande kommt. Im Allgemeinen enthalten aber pathologische Seren sehr hohe Autoantikörper Titer, sodass dies keinen Einfluss auf die positiv/negativ Diskrimination hat.

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

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

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

1. *NEUTRALISIERUNG DER ANTI-MAG-AUTOANTIKÖRPER:* Die Bindung zwischen der mit MAG beschichteten Microtiter-Platte und 5 Seren mit hohen anti-MAG Antikörper-Spiegel, wurde durch eine einstündige Vorinkubation mit 1 to 200 µg/ml MAG und Inkubations-Puffer vor dem eigentlichen Test mit der ELISA Methode, konzentrationsabhängig gehemmt.

2. *SPEZIFITÄT DER ANTI-MAG AUTOANTIKÖRPER BINDUNG:* Fünf Seren mit mittleren bis hohen anti-MAG Autoantikörper Titern sowie fünf negative Seren wurden auf einer GanglioCombi (EK-GCO) Microtiter-Platte getestet welche mit den folgenden Gangliosiden beschichtet sind: asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a, GD1b und GQ1b. Keine der Proben zeigte ein Verhältnis (Ratio) welches grösser als 10% war (Cut-Off Ratio >12%). Auf ähnliche Weise wurden sechs Seren mit hohen anti-Ganglioside Autoantikörper Titer (siehe oben), sowie fünf negative Seren auf MAG beschichteten Microtiter-Platten getestet. Keines dieser pathologischen Seren ergab ein Signal, das höher als 300 BTU war.

3. *VERGLEICH MIT DER IMMUNOBLOT METHODE (WESTERN BLOT):* 127 Seren von Patienten (40 weibliche, 87 männliche, Alter 4-90 Jahren) mit vermutlich anti-MAG verursachten neurologischen Krankheiten wurden mit dem ELISA Test und einer Immunoblot-Methode untersucht. In beiden Methoden wurde aus humanem Zentral-Nervensystem isoliertes MAG eingesetzt. Alle 12 Seren, die mit der ELISA Methode mittelhohe bis sehr hohe anti-MAG-Autoantikörper Werte zeigten, waren auch mit der Immunoblot Methode deutlich positiv. Von den 115 Proben, die einen anti-MAG-Autoantikörper-Spiegel unter dem Grenzwert (Cut-Off) der ELISA Methode hatten, sind auch 114 mit Immunoblot negativ getestet worden. Ein Serum war leicht positiv mit der Immunoblot Methode (F. Ferracin and A.J. Steck, pers. Kommunikation).

4. *VERGLEICH MIT DER IFA (INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY) METHODE:* Es wurden 150 Serumproben von Patienten (Geschlecht und Alter unbekannt) mit diagnostizierter IgM monoklonaler Gammopathie mit Hilfe der ELISA- und einer IFA-Methode getestet. In der IFA Methode wurden Seren mit gefrorenen und Azeton-fixierten Querschnitten von Affen Ischiasnerven inkubiert. Gebundene anti-MAG Antikörper wurden dann mittels anti-

human-IgM Autoantikörper ermittelt. 26 Proben (17.3%) waren mit beiden Methoden positiv getestet. 115 Patienten (76.7%) waren mit beiden Methoden negativ. 5 Proben (3.3%) sind nur mit der IFA Methode und 4 Proben (2.7%) nur mit der ELISA Methode positiv getestet worden (3).

REFENZINTERVALLE UND CUT-OFF RATIO

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

Table 12 angegebenen Ergebnisse wurden erhalten.
HINWEIS: Die angegebenen Werte dienen nur als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor eigene zu erwartende Normalbereiche ermittelt, welche auf ihre Patientenpopulation zutreffen.

Vorgeschlagener Grenzwert (Cut-Off)

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

FRANCAIS

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse BÜHLMANN anti-MAG ELISA a été conçue pour la détermination diagnostique quantitative *in vitro* des auto-anticorps IgM humains dirigés contre la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) (1,2).

PRINCIPE DU DOSAGE

Le test de dosage des autoanticorps anti-MAG ELISA repose sur la technique d'amplification enzymatique quantitative de type "sandwich". Une microplaque précoatée de MAG de cerveau humain hautement purifiée est utilisée. Les calibrateurs et les échantillons sériques sont incubés pendant 2 heures dans les puits de microplaque. Au cours de cette incubation, les auto-anticorps anti-MAG sont liés par la MAG humaine coatée. Après lavage des molécules non-liées, un anticorps dirigé contre les IgM humaines marqué avec la peroxydase de raifort (anti-IgM-HRP) est ajouté dans les puits. La microplaque est incubée pendant 2 heures supplémentaires. Après élimination par lavage des anticorps marqués non-liés, la solution contenant le substrat tétraméthylbenzidine (TMB) est ajoutée dans les puits. La microplaque est incubée pendant 30 minutes. Une coloration bleue se développe proportionnellement à la quantité d'auto-anticorps anti-MAG liés lors de l'étape initiale. La réaction de coloration est stoppée par l'addition d'une solution stop acide (H_2SO_4) faisant passer la couleur du bleu au jaune. L'intensité de la coloration est déterminée par mesure de l'absorbance à 450 nm dans un lecteur de microplaques. L'absorbance mesurée est directement proportionnelle à la concentration d'auto-anticorps anti-MAG présente dans chaque échantillon. Les concentrations inconnues d'auto-anticorps anti-MAG humaine des échantillons sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue au moyen des calibrateurs livrés dans la trousse.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque 96 puits, précoatée-MAG	12 barrettes de 8 puits + support	B-MAG-MP	Prête à l'emploi
Film adhésif	3		
Tampon de lavage concentré (10x) avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-MAG-WB	A reconstituer avec 900 ml d'eau déionisée
Tampon d'incubation avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-MAG-IB	Prêt à l'emploi
Calibrateurs A à D¹ sérum humain avec conservateurs	4 flacons	B-MAG-CASET	A reconstituer avec 1 ml de tampon d'incubation
Contrôles élevé et bas² sérum humain avec conservateurs	2 flacons	B-MAG-CONSET	A reconstituer avec 1 ml de tampon d'incubation
Marqueur Enzymatique IgM anti-IgM-HRP avec conservateurs	1 flacon 11 ml	B-MAG-ELM	Prêt à l'emploi Solution bleue
Substrat TMB	1 flacon	B-TMB	Prêt à l'emploi

TMB en tampon citrate + H_2O_2	11 ml		
Solution Stop 0.25 M H_2SO_4	1 flacon 11 ml	B- STS	Prêt à l'emploi Corrosif

Table 5

- 1 Après reconstitution, les calibrateurs A, B, C et D contiennent respectivement 70000, 15000, 3000 et 1000 Unités de Titration Bühlmann (BTU) d'anticorps anti-MAG.
- 2 Les contrôles contiennent des quantités d'anticorps anti-MAG spécifiques à chaque lot. Il convient de se référer aux limites de confiance communiquées avec chaque lot de production.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non entamés	
Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.	
Réactifs ouverts / reconstitués	
Microplaque	Remplacer immédiatement les barrettes de 8 puits non utilisées dans la pochette contenant le dessiccateur puis la refermer soigneusement. Stable pendant 2 mois à 2-8°C.
Tampon de lavage dilué	Stable pendant 2 mois à 2-8°C.
Calibrateurs	Stables pendant 2 mois à -20°C.
Contrôles	
Tampon d'Incubation	Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.
Marqueur Enzymatique	
Substrat de TMB	
Solution Stop	Stable à 18-28°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.

Table 6

RECOMMANDATIONS ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

A considérer comme potentiellement infectieux :

PRECAUTIONS

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Les calibrateurs (B-MAG-CASET) ainsi que les Contrôles (B-MAG-CONSET) de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées.
- **Substrat TMB et Solution stop:** Le Substrat TMB (B-TMB) contient de la tétraméthylbenzidine (TMB), du peroxyde d'hydrogène et du diméthylfomamide. La Solution stop (B-STs) contient de l'acide sulfurique. Ces substances irritent les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Eviter tout contact avec les yeux, la peau et les habits. En cas de contact accidentel avec les yeux ou la peau, il faut impérativement rincer à grande eau.
- Pour en savoir plus sur les précautions pour la manipulation et l'élimination des réactifs du kit, nous vous recommandons fortement de consulter l'organisme réglementaire compétent pour votre pays.

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte ou de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- **Les puits de la microplaque sont recouverts de cristaux** de sel formés lors du processus de production. Ils sont éliminés par le lavage (voir l'étape 3 de la procédure) et n'ont aucune influence sur les résultats.

- Etapes 3-9: Utiliser des réactifs réfrigérés (2-8°C) pour toutes ces étapes et les conserver réfrigérés durant le pipetage.
 - Etapes 3, 6, 9: S'assurer de vider les puits complètement après le dernier cycle de lavage.
 - Etape 9: S'assurer d'utiliser du substrat TMB préalablement porté à température ambiante (18-28°C).
 - Etape 11: Bien agiter les microplaques durant l'incubation avec le substrat. Les rpms données (400-600) ne s'appliquent pas à tous les agitateurs de microplaques. La solution doit s'agiter dans les puits mais sans déborder.
 - Pour les laveurs automatiques, BÜHLMANN utilise le mode "plate mode" i.e. chaque étape du processus (distribution ou "dispense") est réalisée séquentiellement pour toutes les barrettes, avant de procéder à l'étape suivante du processus (aspiration).
 - Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
 - Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
 - Il convient de prendre toutes les précautions requises pour empêcher toute contamination croisée entre réactifs, entre échantillons ou entre puits.
- Les micropuits sont à usage unique.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision de 2 µl, 100 µl et 1 ml avec pointes jetables.
- Tubes en polystyrène ou polypropylène jetables, pour la préparation des dilutions.
- Eprouvette graduée de 1000 ml pour la préparation du tampon de lavage à partir du concentré.
- Laveur automatique de microplaques ou une pissette pour le tampon de lavage.
- Agitateur de microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La procédure requiert <0.1 ml de sang ou <50 µl de sérum. Les échantillons lipémiques, hémolytiques et ictériques ne devraient pas être utilisés pour ce dosage. Les échantillons lipémiques peuvent être évités en demandant aux patients de jeûner durant au moins 12 heures avant le prélèvement. Prélever le sang dans des tubes prévus à cet usage en évitant l'hémolyse, laisser coaguler à température ambiante (18-28°C) pendant 1 heure, centrifuger durant 15 minutes à environ 1800 x g à température ambiante et recueillir le sérum. Conserver les échantillons de sérum à ≤-20°C. Les échantillons sont stables durant ≥ 1 année s'ils sont stockés à ≤-20°C. Eviter les cycles de congélation et de décongélation. Les échantillons congelés devraient être décongelés et homogénéisés par inversion avant leur utilisation.

PROCEDURE

1. Diluer au 1:1000 les échantillons à analyser avec du tampon d'incubation (ex. 2 µl de sérum et 2 ml de tampon d'incubation) Laisser reposer les échantillons à 18-28°C durant une heure en vortexant de temps à autre. Placer les échantillons sur de la glace pilée pendant 10 minutes avant de procéder à l'étape 4c.
2. Préparer une microplaque avec suffisamment de puits pour recevoir tous les calibrateurs, contrôles et échantillons voulus. Retirer les barrettes excessives du support et les remettre immédiatement au froid dans la pochette prévue à cet effet et contenant le dessiccateur.

Important: Utiliser des solutions réfrigérées pour les étapes 3 à 9.

3. Laver 4 fois chaque puits de la microplaque avec ≥300 µl de Tampon de Lavage. Vider les puits et retourner fermement la microplaque sur du papier absorbant afin de vider les puits.
- 4a. Distribuer 100 µl de tampon d'incubation (blanc) en double dans les puits A1 et A2.
Distribuer 100 µl de calibrateur A en double dans les puits B1 et B2.
Distribuer 100 µl de calibrateur B en double dans les puits C1 et C2.
Distribuer 100 µl de calibrateur C en double dans les puits D1 et D2.
Distribuer 100 µl de calibrateur D en double dans les puits E1 et E2.
- 4b. Distribuer 100 µl de contrôle Bas en double dans les puits F1 et F2.
Distribuer 100 µl de contrôle Elevé en double dans les puits G1 et G2.
- 4c. Distribuer 100 µl les dilutions d'échantillons en double dans les puits suivants.
5. Couvrir la microplaque à l'aide du film adhésif fourni et incubé à 2-8°C pendant 2 heures (± 5 minutes).
6. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver 4 fois chaque puits avec ≥300 µl de tampon de lavage **froid**. Vider les puits et les sécher en tapant fermement la microplaque sur du papier absorbant.
7. Ajouter 100 µl de marqueur enzymatique dans chaque puits.
8. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incubé à 2-8°C pendant 2 heures (± 5 minutes).
9. Retirer et jeter le Film Adhésif. Vider puis laver 4 fois chaque puits avec ≥300 µl de tampon de lavage **froid**. Vider les puits et les sécher en tapant fermement la microplaque sur du papier absorbant.

Important: Laisser le substrat TMB atteindre une température de 18-28°C.

10. Ajouter 100 µl de substrat TMB dans chaque puits.
11. Recouvrir la microplaque d'un film adhésif puis l'incuber sur un agitateur de microplaques à 800-1000 rpm à 18-28°C durant 30 minutes (± 5 minutes). Protéger la microplaque de la lumière directe.
12. Ajouter 100 µl de solution stop dans chaque puits en éliminant les bulles d'air à l'aide de pointes de pipettes. Passer à l'étape 13 dans les 30 minutes suivantes.
13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. La lecture bichromatique à 450 nm avec un filtre de référence à 600 ou 620 nm est conseillée.

STANDARDISATION

Les calibrateurs de cette trousse a été calibré à l'aide d'une référence interne ont été calibrés par rapport à un pool de référence interne constitué de plus de 10 sérums humains présentant des taux d'auto-anticorps anti-MAG, respectivement bas, moyens ou élevés. Les taux et la spécificité de chaque sérum du pool de référence ont été préalablement analysés par immuno-blots anti-MAG.

Les **Bühlmann Titer Units (BTU)** (ou unités de titrage Bühlmann) ont été établies comme suit:

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

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

RESULTATS

Courbe d'étalonnage

- Mesurer l'absorbance à 450 nm pour chaque calibrateur (en double).
- Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues.
- Reporter les moyennes d'absorbance à 450 nm obtenues (sur l'axe vertical, linéaire) des calibrateurs par rapport à leur titre exprimé en BTU (voir plus bas, prochain chapitre) (axe horizontal logarithmique) sur un papier à quadrillage semi-logarithmique.
- 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 puit contenant un échantillon ou un contrôle.
- Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues.
- Lire le titre des échantillons et contrôles au moyen de la courbe d'étalonnage en reportant l'absorbance moyenne obtenue sur la courbe d'étalonnage et en traçant une ligne verticale par ce point. L'intersection de cette droite verticale avec l'axe horizontal indiquant la valeur titre.

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

Exemples de résultats et de courbe d'étalonnage(cf. Table 11 et Figure 1)

Ces résultats et cette courbe 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 de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail de laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

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

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

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage et des valeurs des contrôles devraient être compris dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire. Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de 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) la solution de substrat TMB devrait être incolore, vi) pureté de l'eau.

LIMITATIONS

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

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision intra-essai: 6.5%. La précision intra-essai a été calculée à partir des mesures de 20 duplicatas de chaque échantillon lors d'un seul et même essai (cf. Table 13).

Précision inter-essai: 15.4%. La précision inter-essai a été calculée à partir des résultats de 20 duplicatas de chaque échantillons lors de 20 essais différents (cf. Table 14).

Linéarité de dilution: 147%. 7 échantillons sériques humains présentant des taux élevés d'auto-anticorps anti-MAG ont été dilués du 1000^{ème} au 64000^{ème} (de 1:1000 à 1: 64000) avec du le tampon d'incubation, puis incubés durant une heure à 18-28°C puis dosés selon le protocole standard (cf. Table 15). Il est probable que la haute déviation observée dans environ 50% des échantillons soit due à l'agrégation d'anticorps. En général, les sérums pathologiques présentent des taux d'autoanticorps très élevés. Cette déviation n'a en conséquence pas d'influence sur l'interprétation des résultats.

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

Limite de quantification (LoQ) : 1000 BTU. 20 duplicatas de faibles titres d'autoanticorps anti-MAG ont été testés lors d'un seul et même essai. La moyenne, l'écart type (SD) et le coefficient de variation (CV) des valeurs d'absorbance ont été calculés. Un taux de 1000 BTU a été obtenu, avec un CV inférieur à 10%.

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

1. *NEUTRALISATION DES AUTO-ANTICORPS ANTI-MAG:* La fixation de 5 sérums présentant des taux élevés d'auto-anticorps anti-MAG à la microplaque coatée de MAG a pu être inhibée d manière concentration-dépendante lorsque pré-incubés durant une heure dans du tampon d'incubation additionnée de 1 à 200 µg/ml de MAG avant le test effectif par ELISA.

2. *SPECIFICITE DE LIAISON DES AUTO-ANTICORPS ANTI-MAG:* 5 sérums présentant des taux moyens à élevés d'auto-anticorps anti-MAG ainsi que 5 sérums testés négatifs à l'aide du test anti-MAG ont été analysés au moyen d'une microplaque GanglioCombi (EK-GCO) revêtue d'asialogM₁, GM₁, GM₂, GD_{1a}, GD_{1b} et GQ_{1b}. Aucun échantillon n'a présenté de rapport supérieur à 10% (valeur seuil > 12%). De manière similaire, six sérums avec de hauts taux d'autoanticorps anti-Ganglioside (voir plus haut) ainsi que 5 sérums négatifs ont été testés sur des microplaques revêtues de MAG. Aucun de ces échantillons « pathologiques » n'a présenté un signal supérieur à 300 BTU.

3. *COMPARAISON AVEC LA METHODE IMMUNOBLOT (WESTERN BLOT):* 127 échantillons sériques (40 femmes, 87 hommes âgés de 4 à 90 ans) atteints de neuro-pathologies

soupçonnées d'être causées par des auto-anticorps anti-MAG ont été testés par la méthode ELISA et par immunoblot. La glycoprotéine MAG, isolée du système nerveux central (SNC) humain, a été utilisée avec les deux méthodes. Tous les 12 sérums présentant des taux d'auto-anticorps anti-MAG moyens à très hauts par ELISA ont également été positifs par immunoblot. 114 des 115 échantillons présentant un taux d'auto-anticorps anti-MAG sérique inférieur à la valeur seuil par ELISA ont également été négatifs par immunoblot alors qu'un seul échantillon est resté faiblement positif par immunoblot (F. Ferracin and A.J. Steck, résultats non publiés).

COMPARAISON AVEC LA METHODE IFA (INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY): Les sérums de 150 patients (de sexe et âge inconnus) atteints de gammopathies monoclonales d'IgM ont été testés par ELISA et IFA. Dans la méthode IFA, les sérums ont été incubés sur des sections de nerf sciatique de singe congelées et fixées à l'acétone. Les auto-anticorps anti-MAG ont été détectés par anticorps FITC-marqués dirigés contre les IgM humaines. 26 patients (17.3%) ont été positifs et 115 (76.7%) étaient négatifs avec les deux méthodes, alors que 5 sérums (3.3%) étaient positifs par la méthode IFA uniquement et 4 sérums (2.7%) étaient positifs par la méthode ELISA uniquement (3).

INTERVALES DES REFERENCES VALEURS SEUIL (CUT-OFF)

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

Table 12 pour les résultats obtenus.

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

Cut-off/Valeur Seuil Proposé(e)

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

ITALIANO

USO

Il BÜHLMANN anti-MAG ELISA è un test diagnostico quantitativo *in vitro* per la determinazione degli autoanticorpi IgM umani diretti verso la glicoproteina associata alla mielina (MAG) (1, 2).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il dosaggio autoanticorpi anti-MAG ELISA utilizza la tecnica per immunodosaggi quantitativi tipo sandwich amplificata enzimaticamente. La MAG ALTAMENTE PURIFICATA DAL CERVELLO UMANO (2) è stata precoatata su micropiastra. I calibratori ed i sieri dei pazienti vengono incubati per due ore nei pozzetti; gli autoanticorpi anti-MAG presenti vengono legati dalla MAG umana immobilizzata. Dopo il lavaggio delle sostanze non legate, gli anticorpi marcati con perossidasi di rafano anti IgM umane (anti-IgM-HRP) vengono aggiunti ai pozzetti ed incubati per altre due ore. Dopo lavaggio, la soluzione di substrato contenente TMB (tetrametilbenzidina) viene aggiunta ai pozzetti ed incubata per 30 minuti. Si sviluppa una colorazione blu proporzionale al quantitativo di autoanticorpi anti-MAG inizialmente legati. Lo sviluppo della colorazione viene bloccato con l'aggiunta di una soluzione bloccante acidica (H₂SO₄) che cambia il colore della soluzione da blu a giallo. L'intensità dell'assorbanza del colore viene misurata in un lettore di micropiastra alla lunghezza d'onda di 450 nm. L'assorbanza misurata è direttamente proporzionale alla concentrazione di autoanticorpi anti-MAG umani. Un set di calibratori di autoanticorpi anti-MAG umana viene utilizzato per tracciare una curva standard dell'assorbanza verso le unità titolate di autoanticorpi umani anti-MAG dai quali è possibile calcolare la concentrazione di autoanticorpi anti-MAG umana nei campioni non noti.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

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

Siero umano con conservanti			Tampone di Incubazione
Marcato enzimatico IgM anti-IgM-HRP in un tampone su base proteica con conservanti.	1 flacone 11 ml	B-MAG-ELM	Pronto all'uso Soluzione Blu
Substrato di TMB TMB in un tampone citrato con H ₂ O ₂	1 flacone 11 ml	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione stoppante 0.25 M di acido solforico	1 flacone 11 ml	B-STTS	Pronto all'uso Agente corrosivo

Table 7

¹ Dopo la ricostituzione, i Calibratori A, B, C e D contengono rispettivamente 70000, 15000, 3000 e 1000 Unità Titolate Bühlmann (BTU) di anticorpi anti-MAG.

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

CONSERVAZIONE ED EMI-VITA DEI REAGENTI

Reagenti Sigillati	
Conservare a 2-8°C. Non utilizzare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.	
Reagenti Aperti/ Ricostituiti	
Micropiastra	Riporre le strip non utilizzate immediatamente nella busta che contiene il dessiccante e risigillare completamente chiudendo la zip. Conservare fino a 2 mesi a 2-8°C.
Tampone di lavaggio diluito	Conservare fino a 2 mesi a 2-8°C.
Calibratori	Conservare fino a 2 mesi a -20°C.
Controlli	
Tampone d'incubazione	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza.
Marcato enzimatico IgM	
Substrato di TMB (protegge dal luce)	
Soluzione stoppante	Conservare a 18-28°C fino alla data di scadenza.

Table 8

PRECAUZIONI

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- Il calibratore (B-SGPG-CA) ed i controlli di questo kit (B-SGPG-CONSET) contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio utilizzando le dovute precauzioni.
- Substrato e Soluzione Stoppante:** Il Substrato TMB(B-TMB) contiene tetrametilbenzidina (TMB), perossido di idrogeno e dimetilformamide. La Soluzione Bloccante (B-STTS) contiene acido solforico. Ciascuno di questi reagenti è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con gli occhi, la pelle ed il vestiario. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua.
- In merito alle precauzioni adeguate per lo smaltimento di reagenti del kit, consigliamo vivamente di consultare prima le normative locali speciali del proprio paese.

PRECAUZIONI TECNICHE

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- Residui rimasti nei pozzetti** sono causati dal processo di produzione. Questi residui vengono completamente eliminati dai lavaggi durante la procedura descritta e non compromettono in alcun modo i risultati. (fare riferimento al punto 3 delle istruzioni per l'uso).
- Punto 3-9:** Utilizzare e mantenere i reagenti refrigerati (2-8°C) durante la dispensazione.
- Punto 3, 6, 9:** Dopo l'ultimo ciclo di lavaggio delle strip, assicurarsi che i pozzetti siano completamente vuoti.
- Punto 9:** Assicurarsi prima dell'uso che il substrato TMB raggiunga 18-28°C.
- Punto 11:** Assicurarsi una buona agitazione della micropiastra durante l'incubazione con il Substrato TMB bene. A seconda del tipo di agitatore è consigliata una velocità di 400-600 rpm. La micropiastra deve essere agitata efficacemente, ma facendo in modo di evitare la fuoriuscita di liquido.
- Usando **dispositivi automatici per lavaggio/ aspirazione** della micropiastra, BÜHLMANN consiglia l'utilizzo della modalità: "plate mode"; dispensazione sequenziale in tutte le strip e successiva aspirazione.

- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Fare ogni tentativo per assicurarsi che tra i reagenti, i campioni o tra i pozzetti non vi siano contaminazioni incrociate.
- I micropozzetti non possono essere riutilizzati.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

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

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La procedura richiede <0.1 ml di sangue o <50 µl di siero. Campioni lipemici, emolizzati ed iterici, non devono essere usati in questa analisi. I campioni lipemici possono essere evitati chiedendo ai pazienti di digiunare per almeno 12 ore prima del prelievo del campione. Prelevare i campioni di sangue in provette semplici, evitando l'emolisi, lasciare coagulare per un'ora a temperatura ambiente (18-28°C), centrifugare per 15 minuti a circa 1800 x g a temperatura ambiente e prelevare il siero. Conservare i campioni di siero a ≤-20°C. I campioni sono stabili per ≥1 anno se conservati a ≤-20°C. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo. I campioni congelati devono essere scongelati e mescolati completamente capovolgendoli o scuotendoli leggermente prima dell'utilizzo.

DOSAGGIO

1. Diluire tutti i campioni dei pazienti 1:1000 con il Tampone d'incubazione (ad es.: 2 µl di siero + 2 ml di Tampone di Incubazione). Lasciare che i campioni diluiti riposino un'ora a 18-28°C, vortexare di tanto in tanto. Collocare i campioni per 10 minuti nel ghiaccio prima di dispensare al punto 4c.
2. Preparare una piastra con strip a sufficienza per testare il numero desiderato di Calibratori, controlli e campioni. Togliere le strip in eccedenza dal supporto e risigillarle **subito** nella busta con il desiccante. Conservare refrigerato.

Importante: Utilizzare soluzioni di reagenti refrigerate dal punto 3. al punto 9.

3. Lavare i pozzetti coattati quattro volte utilizzando almeno 300 µl di Soluzione di lavaggio refrigerata per pozzetto. Vuotare i pozzetti e blottare la piastra su carta assorbente.
- 4a. Dispensare 100 µl di Soluzione d'incubazione (come bianco) in duplicato nei pozzetti A1+A2.
Dispensare 100 µl dello Calibratore A in duplicato nei pozzetti B1+B2.
Dispensare 100 µl dello Calibratore B in duplicato nei pozzetti C1+C2.
Dispensare 100 µl dello Calibratore C in duplicato nei pozzetti D1+D2.
Dispensare 100 µl dello Calibratore D in duplicato nei pozzetti E1+E2.
- 4b. Dispensare 100 µl del Controllo basso in duplicato nei pozzetti F1+F2.
Dispensare 100 µl del Controllo alto in duplicato nei pozzetti G1+G2.

- 4c. Dispensare 100 µl di ciascun campione diluito in duplicato nei pozzetti successivi.
 5. Coprire la piastra con un Foglio sigillante ed incubare per 2 ore (± 5 min) a 2-8°C.
 6. Togliere ed eliminare il Foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare quattro volte utilizzando almeno 300 µl di Tampone di lavaggio **refrigerato** per pozzetto. Svuotare i pozzetti e blottare la piastra su carta assorbente.
 7. Aggiungere 100 µl di Marcato enzimatico IgM a tutti i pozzetti.
 8. Coprire la piastra con un Foglio sigillante ed incubare per 2 ore (± 5 min) a 2-8°C.
 9. Togliere ed eliminare il Foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare quattro volte utilizzando almeno 300 µl di Tampone di lavaggio **refrigerato** per pozzetto. Svuotare i pozzetti e blottarli su carta assorbente.
- Importante: Lasciare che la Soluzione di Substrato TMB raggiunga la temperatura di 18-28°C.**
10. Aggiungere 100 µl di Soluzione di substrato TMB ad ogni pozzetto.
 11. Coprire la piastra con un Foglio sigillante, collocare la piastra su di un mixer settato a 800-1000 rpm, proteggere la piastra dalla luce diretta ed incubare per 30 minuti (± 5 min) a 18-28°C.
 12. Aggiungere 100 µl di Soluzione stoppante a tutti i pozzetti. Eliminare le bolle d'aria con una pipetta. Procedere con il punto 13. entro 30 minuti.
 13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore di micropiastra. Se è disponibile la correzione della lunghezza d'onda, settare lo strumento ad una lunghezza d'onda doppia, a 450 nm con un fattore di correzione del background da 600 o 620 nm.

STANDARDIZZAZIONE

I Calibratori del kit sono stati calibrati vs. un pool interno di riferimento. Il pool di Riferimento consiste in più di 10 sieri umani contenenti rispettivamente, titoli, bassi, medi ed elevati di anticorpi anti-MAG. Titoli e specificità di ciascun siero nel pool di riferimento sono stati inizialmente analizzati con immunoblot anti-MAG.

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

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

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

RESULTATI E CALCOLO

Curva Standard

- Memorizzare l'assorbanza a 450 nm per ciascun Calibratore.
- Fare la media dei valori duplicati.
- Tracciare i valori di assorbanza media (asse verticale) vs. BTU (vedi capitolo seguente) degli Calibratore (asse orizzontale) utilizzando una carta per grafici lin/log.
- Disegnare la curva che meglio si adatta ai punti Calibratore o elaborare attraverso un algoritmo computerizzato una curva spline.

Campioni e Controlli

- Memorizzare l'assorbanza a 450 nm per ciascun campione e pozzetto di controllo.
- Calcolare la media dei valori in duplicato.
- Localizzare i valori di assorbanza dei campioni e dei controlli sull'asse verticale, tracciare una linea orizzontale che intersechi la curva Calibratore e leggere dall'asse orizzontale.

NOTA: Se il lettore di micropiastre non è in grado di leggere assorbanze maggiori di 2 o superiori all'assorbanza dello Calibratore più elevato (Calibratore A), si consiglia una seconda lettura alla lunghezza d'onda di 490 o 492 nm (sono disponibili filtri di riferimento a 600 o 620 nm). In questo caso, procedere alla costruzione di una seconda curva standard con le letture delle assorbanze di tutti gli Calibratori a 490 o 492 nm. La concentrazione dei campioni fuori scala a 450 nm vengono lette dalla nuova curva standard come più sopra descritto. Le letture a 490 o 492 nm non devono sostituire le letture in scala a 450 nm.

NOTA: Esempio di risultati: vedi Table 11 e Figure 1. Questi risultati sono forniti a solo scopo dimostrativo. I valori dell'assorbanza del calibratore e dei controlli devono essere generati per ciascuna seduta analitica.

LIMITI DELLE PRESTAZIONI

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

CONTROLLO DI QUALITÀ

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

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

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

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

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Precisione Intra-Dosaggio (Intra-Seduta): 6.5%. La precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori ottenuti in un'unica seduta. (cf. Table 13).

Precisione Inter-Dosaggio (Da seduta a Seduta): 15.4%. La precisione inter-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori ottenuti in 20 sedute diverse. (cf. Table 14).

Linearità/Parallelismo di Diluzione: 147%. Sette sieri umani contenenti alte concentrazioni di anticorpi anti-MAG sono stati diluiti con Tampone d'incubazione 1:1000 fino a 1:64000, lasciati per un ora a 18-28°C ed in seguito determinanti seguendo le istruzioni di procedura. Si considera che la deviazione relativamente elevata in ca. 50% dei campioni sia dovuta a delle aggregazioni di anticorpi. In genere, campioni patologici mostrano

concentrazioni altamente elevate, e dunque non ha un influsso nella discriminazione tra positivo e negativo.(cf. Table 15).

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

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

Specificità: Sono stati effettuati 4 set di esperimenti per determinare la specificità del dosaggio BÜHLMANN anti-MAG ELISA:

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

2. *Specificità del legame degli autoanticorpi anti-MAG:* cinque sieri di medi ed alti titer d'anticorpi anti-MAG e cinque sieri negativi sono stati determinati su una micropiastra GanglioCombi (EK-GCO) coattata con asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a, GD1b e GQ1b. Nessuno dei campioni ha mostrato rapporti maggiori a 10% (rapporto taglio >12%). Similarmente, sei sieri con alte concentrazioni d'auto-anticorpi anti-gangliosidi (veda sopra) e cinque sieri negativi sono stati determinati su micropiastre coattate con MAG. Nessuno di questi campioni positivi ha dato segnali maggiori a 300 BTU

3. *Comparazione con Immunoblot (Western Blot):* 127 campioni di sieri (40 femmine; 87 maschi; età 4-90 anni) con malattie neurologiche presumibilmente causate da autoanticorpi anti-MAG sono stati testati rispettivamente con il metodo ELISA e Western Blot. MAG isolata dal sistema nervoso centrale umano (CNS) è stata utilizzata in entrambi i metodi. Tutti e 12 i sieri che presentano titoli da medi a molto elevati di autoanticorpi anti-MAG IgM nella procedura ELISA si sono rivelati chiaramente positivi se analizzati con immunoblot. 114 sieri su 115 che presentavano titoli di anticorpi IgM anti-MAG al di sotto del valore di cut-off ELISA erano negativi anche se analizzati con immunoblot, mentre 1 siero era leggermente positivo solo con il metodo immunoblot. (F. Ferracin and A.J. Steck, risultati non pubblicati).

4. *Comparazione con il dosaggio ad immunofluorescenza Indiretta (IFA):* I sieri di 150 pazienti (sesso ed età ignoti) con gammopatie monoclonali IgM diagnosticate sono stati testati rispettivamente con un metodo ELISA ed un metodo IFA. Nel metodo IFA, i sieri sono stati incubati su sezioni di nervo sciatico di scimmia congelato e fissato con acetone; gli anticorpi legati anti-MAG erano stati individuati con anticorpi anti-IgM umane marcati con FITC. 26 pazienti (17.3%) erano positivi e 115 pazienti (76.7%) erano negativi con entrambi i metodi, mentre 5 sieri (3.3%) erano positivi solo con il metodo IFA e 4 sieri (2.7%) erano positivi solo con il metodo ELISA, rispettivamente (3).

VALORI DI CUT-OFF E STANDARDIZZAZIONE

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

Table 12 sono riportati i risultati ottenuti.

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

Cut-off titolati suggeriti

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

ESPAÑOL

USO PREVISTO

El BÜHLMANN anti-MAG ELISA ha sido diseñado para realizar la determinación diagnóstica *in vitro* cuantitativa de autoanticuerpos IgM humanos dirigidos contra la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (1,2).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) de autoanticuerpos anti-MAG utiliza la técnica cuantitativa de inmunoenzimático intercalado con amplificación enzimática. Se ha recubierto previamente una Microplaca con MAG ALTAMENTE PURIFICADA DE CEREBRO HUMANO. Los sueros Calibradores y del paciente se incuban durante dos horas en los pocillos de microtitulación y los autoanticuerpos anti-MAG presentes se unen a la MAG humana inmovilizada. Después de eliminar con el lavado las sustancias no unidas, se añaden a los pocillos anticuerpos contra IgM humana marcados con peroxidasa de rábano (anti-IgM-HRP) y se incuban durante dos horas más. Después de un paso de lavado se añade a los pocillos la solución de sustrato que contiene TMB (Tetrametilbenzidina) y se incuban durante 30 minutos. Se desarrolla una coloración azul proporcional a la cantidad de autoanticuerpos anti-MAG unidos en el paso inicial. El desarrollo del color se detiene con la adición de una solución de interrupción ácida (H_2SO_4) que vira la solución de azul a amarillo. La intensidad de la absorbancia del color se mide en un lector de placas de microtitulación a una longitud de onda de 450 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la concentración de autoanticuerpos anti-MAG humana. Se utiliza un conjunto de Calibradores de autoanticuerpos anti-MAG humana para trazar una curva estándar de absorbancia frente a unidades de titulación de autoanticuerpos anti-MAG humana, a partir de la cual pueden calcularse las concentraciones de autoanticuerpos anti-MAG humana en los desconocidos.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Microplaca 96 pocillos recubiertos con MAG humana	12 tiras de 8 pocillos con soporte	B-MAG-MP	Listo para usar
Sellador de placas	3 unidades		
Tampón de lavado concentrado (10x) con conservantes	1 botella 100 ml	B-MAG-WB	Diluir con 900 ml de agua desionizada
Tampón de incubación con conservantes	1 botella 100 ml	B-MAG-IB	Listo para usar
Calibrador A a D¹ Suero humano con conservantes	4 viales	B-MAG-CASET	Añadir 1 ml de tampón de incubación
Control bajo y alto² Suero humano con conservantes	2 viales	B-MAG-CONSET	Añadir 1 ml de tampón de incubación
marcada enzimáticamente IgM anti-IgM-HRP en un tampón de proteínas con conservantes	1 vial 11 ml	B-MAG-ELM	Listo para usar Solución azul

Substrato de TMB TMB en tampón citrato con H ₂ O ₂	1 vial 11 ml	B-TMB	Listo para usar
Solución de parada Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 11 ml	B- STS	Listo para usar Agente corrosivo

Table 9

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

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

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Almacénese a 2-8°C. No utilice el kit después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Microplaca	Guarde inmediatamente las tiras que no ha utilizado en la bolsa metalizada que contiene los sacos desecantes y vuelva a cerrarla completamente por toda la cremallera. Almacénese hasta 2 meses a 2-8°C.
Tampón de lavado diluido	Almacénese hasta 2 meses a 2-8°C.
Calibradores	Almacénese hasta 2 meses a -20°C.
Controles	
Tampón de incubación	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Marcador enzimático IgM	
Substrato de TMB (protege de luz)	
Solución de parada	Almacénese a 18-28°C hasta la fecha de caducidad.

Table 10

PRECAUCIONES

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Los Calibradores (B-MAG-CASET) y los controles (B-MAG-CONSET) de este kit contienen componentes de origen humano. Aunque se ha comprobado y encontrado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, tomando las precauciones adecuadas.
- Solución substrato y solución de interrupción:** La solución substrato (B-TMB) contiene tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrógeno y dimetilformamida. La solución de interrupción (B-STs) contiene ácido sulfúrico. Los dos reactivos pueden irritar los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Después del contacto con los ojos o la piel lave inmediatamente con agua abundante.
- Las soluciones/reactivos no utilizados deben eliminarse según la normativa local.

PRECAUCIONES TÉCNICAS

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Residuos pueden formarse en los pocillos** durante el proceso de la producción. Ellos están eliminados completamente durante lavar los pocillos y no tienen ninguna influencia en los resultados (véase a punto 3 de la instrucción de uso).

- Pasos 3-9: Utilice los reactivos refrigerados (2-8°C) en todos estos pasos y mantíenlos a 2-8°C mientras de pipetear.
- Pasos 3, 6 y 9: Cerciórese de vaciar los pocillos totalmente después del último ciclo que de lavado.
- Paso 9: Cerciórese de utilizar el substrato de TMB que fue equilibrado a la temperatura ambiente (18-28°C).
- Paso 11: Agite las placas del microtitulación bien durante la incubación con el substrato. Las RPM dadas (400-600) no solicitan cada rotor. La solución debe moverse en pocillos – evite salpicaduras.
- BÜHLMANN utilice una **lavadora de placa automatizada**, programada en "modo supuesto de placa" es decir que cada paso de proceso (dispense) se realiza en todas las tiras secuencialmente, antes de procesar al paso siguiente (aspiración).
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- Debe hacerse todo lo posible para garantizar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos, muestras o entre pocillos.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables: pipetas de 2 µl, 100 µl y 1 ml.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro de 1000 ml para la dilución del tampón de lavado concentrado.
- Lavador de placas de microtitulación o botella flexible para el tampón de lavado.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

El procedimiento requiere <0,1 ml de sangre o <50 µl de suero. Muestras lipemicas, hemoliticas o ictericas pueden interferir con el ensayo y no deben ser utilizadas.

Recoja la sangre en tubos limpios, evite la hemólisis, deje coagular durante una hora a temperatura ambiente (18-28°C), centrifugue durante 15 minutos a aproximadamente 1800 x g a temperatura ambiente y recoja el suero.

Almacene las muestras de suero a ≤-20°C. Las muestras son estables durante ≥1 año si se almacenan a ≤-20°C. Evite ciclos repetidos de congelación-descongelación. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente por agitación o inversión suave antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Diluya todas las muestras del paciente 1:1000 con el Tampón de incubación (*p.ej.* 2 µl de suero + 2 ml de Tampón de incubación). Mantenga las muestras diluidas durante una hora a 18-28°C y mezcle de vez en cuando con una agitadora vortical. Coloque las muestras en hielo durante 10 minutos antes de pipetear en el paso 4c.
2. Preparar una placa con tiras suficientes para probar el número deseado de Calibradores, controles y muestras. Retire las tiras sobrantes del soporte y guárdelas en la bolsa metalizada junto con los Sacos desecantes **sin demora**. Almacénelo refrigerado.

Importante: utilice soluciones refrigeradas de los reactivos en los pasos 3 a 9

3. Lave los pocillos recubiertos cuatro veces utilizando como mínimo 300 µl de Tampón de lavado refrigerado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
- 4a. Pipetee 100 µl de Tampón de incubación (como blanco) por duplicado en los pocillos A1+A2.
Pipetee 100 µl de Estándar A por duplicado en los pocillos B1+B2.
Pipetee 100 µl de Estándar B por duplicado en los pocillos C1+C2.
Pipetee 100 µl de Estándar C por duplicado en los pocillos D1+D2.
Pipetee 100 µl de Estándar D por duplicado en los pocillos E1+E2.
- 4b. Pipetee 100 µl del Control bajo por duplicado en los pocillos F1+F2.
Pipetee 100 µl del Control alto por duplicado en los pocillos G1+G2.
- 4c. Pipetee 100 µl de cada muestra diluida en los pocillos subsiguientes.
5. Cubra la placa con un Sellador de placa e incube durante 2 horas (± 5 min) a 2-8°C.
6. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos cuatro veces utilizando como mínimo 300 µl de Tampón de lavado **refrigerado** por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
7. Añada 100 µl de Marcador enzimático IgM a todos los pocillos.
8. Cubra la placa con un Sellador de placa e incube durante 2 horas (± 5 min) a 2-8°C.
9. Retire y deseche el Sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos cuatro veces utilizando como mínimo 300 µl de Tampón de lavado **refrigerado** por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

Importante: Deje que la Solución sustrato de TMB alcance 18-28°C.

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 min) a 18-28°C.
12. Añada 100 µl de Solución de parada a todos los pocillos. Elimine las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Continúe con el paso 13 al cabo de 30 minutos como máximo.
13. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación. Si se dispone de corrección de longitud de onda, prepare el instrumento para una medición de longitud de onda dual a 450 nm con corrección de longitud de onda de ruido de fondo ajustada a 600 ó 620 nm.

RESULTADOS

Curva estándar

- Registre la absorbancia a 450 nm para cada estándar.
- Calcule el promedio de los valores duplicados.
- Represente los valores de absorbancia promedios (eje vertical) frente a BTU (véase capítulo siguiente) de los Calibradores (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.
- Localice los valores de absorbancia de las muestras y de los controles en el eje vertical, dibuje una línea horizontal que corte la curva estándar y lea en el eje horizontal.

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

Importante: Podrá encontrar un ejemplo de los resultados en Table 11 y Figure 1. Se deben generar valores de absorbancia del calibrador y los controles para cada conjunto de muestras que se vaya a ensayar.

ESTANDARIZACIÓN

Los Calibradores del kit se calibraron frente a una reserva de referencia interna. La reserva de referencia consiste en más de 10 sueros humanos que contienen titulaciones bajas, medias y altas de anticuerpos anti-MAG, respectivamente. Las titulaciones y la especificidad de cada suero en la reserva de referencia se analizaron en primer lugar con técnicas de inmunotransferencia anti-MAG.

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

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

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

CONTROL DE CALIDAD

Es necesaria una completa comprensión de este prospecto para que el uso del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente este prospecto.

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

Todos los controles deben encontrarse dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de control 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 sustrato con TMB debe ser incolora vi) pureza del agua.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Precisión intra-ensayo (dentro de la prueba): 6.5%. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores obtenidos en una única prueba (cf. Table 13).

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 15.4%. La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores obtenidos en 20 pruebas diferentes (cf. Table 14).

Linealidad/paralelismo de dilución: 147%. Se han diluido siete muestras de suero humanos ricos de anti-MAG anticuerpos con tampón de incubación de 1:1000 a 1:64000. Las pruebas diluidas han sido a 18-28°C y han sido examinados por el procedimiento del ensayo (cf. Table 15). La desviación relativamente alta en 50% de sueros resulta de agregados de anticuerpos. Por lo general la titulación de los sueros patológicos es elevada. Por eso la titulación no perjudica la discriminación entre pruebas positivas y negativas.

Sensibilidad analítica: 444 BTU. Se ensayaron 20 pruebas de tampón de incubación en un único curso. El promedio y (también) la desviación de estándar (SD) se calcularon de los valores de absorbancia.

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

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

1. *Neutralización de autoanticuerpos anti-MAG:* 5 sueros con titulaciones anti-MAG altas podría inhibirse de la unión a las placas de microtitulación recubiertas con MAG de manera dependiente de la concentración cuando se preincubaban durante una hora con tampón de incubación con un suplemento de 1 a 200 µg/ml de MAG antes de probarlos en el ELISA.

2. *Especificidad de la unión de autoanticuerpos anti-MAG:* Cinco sueros con titulaciones medias a muy altas de autoanticuerpos anti-MAG y cinco sueros negativos se probaron en placas recubiertas con asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a, GD1b y GQ1b. Ninguna de las muestras mostró una proporción superior a 10% (cociente de corte >12%). Del mismo modo una serie de sueros de enfermedades neurológicas (titulaciones anti-MAG altas) y negativas a autoanticuerpos antigangliosidos se probaron en placas recubiertas con anti-MAG. Ninguno de los sueros

de estas enfermedades produjo una señal superior a 300 BTU.

3. *Comparación con inmunotransferencia (Western Blot):* Los sueros de 127 pacientes (40 mujeres; 87 hombres; edad 4-90 años) con enfermedades neurológicas causadas presuntamente por autoanticuerpos anti-MAG se probaron con el método ELISA y un método "western blot", respectivamente. Se utilizó MAG aislado de sistema nervioso central (SNC) humano en los dos métodos. Los 12 sueros que mostraban titulaciones medias a muy altas de autoanticuerpos IgM anti-MAG en el procedimiento ELISA también fueron claramente positivos cuando se analizaron por inmunotransferencia. 114 de los 115 sueros que mostraban titulaciones de anticuerpos anti-MAG por debajo del valor de corte del ELISA también fueron negativos cuando se analizaron con inmunotransferencia, mientras que un suero fue ligeramente positivo por el método de inmunotransferencia únicamente (F. Ferracin and A.J. Steck, resultados no publicados).

4. *Comparación con el Ensayo indirecto de inmunofluorescencia (IFA):* Los sueros de 150 pacientes (sexo y edad desconocidos) diagnosticados de gammopatías monoclonales IgM se probaron respectivamente con el método ELISA y con un método IFA. En el método IFA los sueros se incubaron en secciones del nervio ciático de mono congeladas y fijadas con acetona y la unión de anticuerpos anti-MAG se detectó con anticuerpos anti-IgM humana marcados con FITC. 26 pacientes (17,3%) fueron positivos y 115 pacientes (76,7%) fueron negativos en los dos métodos, mientras que 5 sueros (3,3%) fueron positivos solamente con el método IFA y 4 sueros (2,7%) fueron positivos sólo con el método ELISA, respectivamente (3).

INTERVALOS DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE

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

Table 12.

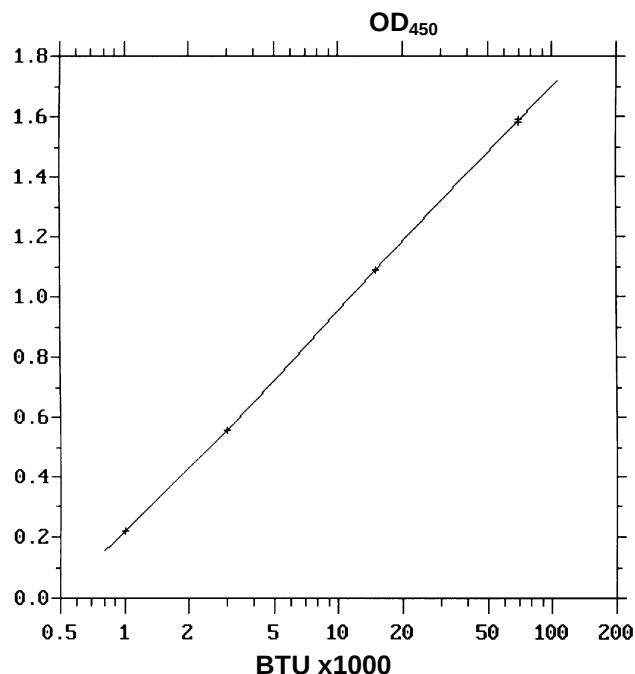
NOTA: Estos rangos de titulación deben utilizarse únicamente como orientativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos esperados para su población de pacientes.

Titulación de corte propuesta

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

Table 11: **Examples of results**

	Conc. [BTU]	Absorbance [OD]	Calc. Conc. [BTU]	CV Conc. [%]
Blank 1		0.063		
Blank 2		0.058		
Average		0.060		
Calibrator A	70000	1.591	71099	
Calibrator A	70000	1.581	68917	
Average	70000	1.586	70000	0.6
Calibrator B	15000	1.090	15045	
Calibrator B	15000	1.088	14954	
Average	15000	1.089	15000	0.6
Calibrator C	3000	0.554	2986	
Calibrator C	3000	0.557	3013	
Average	3000	0.556	3000	0.4
Calibrator D	1000	0.220	1004	
Calibrator D	1000	0.218	996	
Average	1000	0.219	1000	2.2
Control LOW		0.425	2017	
Control LOW		0.426	2023	
Average		0.426	2020	0.2
Control HIGH		1.261	25486	
Control HIGH		1.281	27113	
Average		1.271	26299	4.4
Sample 1		0.078	265	
Sample 1		0.079	272	
Average		0.079	268	1.9
Sample 2		1.168	19123	
Sample 2		1.186	20218	
Average		1.177	19670	3.9

Figure 1: **Example of Standard Curve**Table 12: **Cut-off values and Standardization**

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

Table 13: **Intra-Assay Precision (Within-Run)**

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

Table 14: **Inter-Assay Precision (Run-to-Run)**

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

Table 15: **Dilution Linearity**

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

Table description: cf. “Results”, and “Cut-Off Values and Standardization”) and “Performance Characteristics”

Tabellenbeschreibung: siehe “Resultate” “Grenzwert und Standardisierung” und “Leistungs-merkmale”

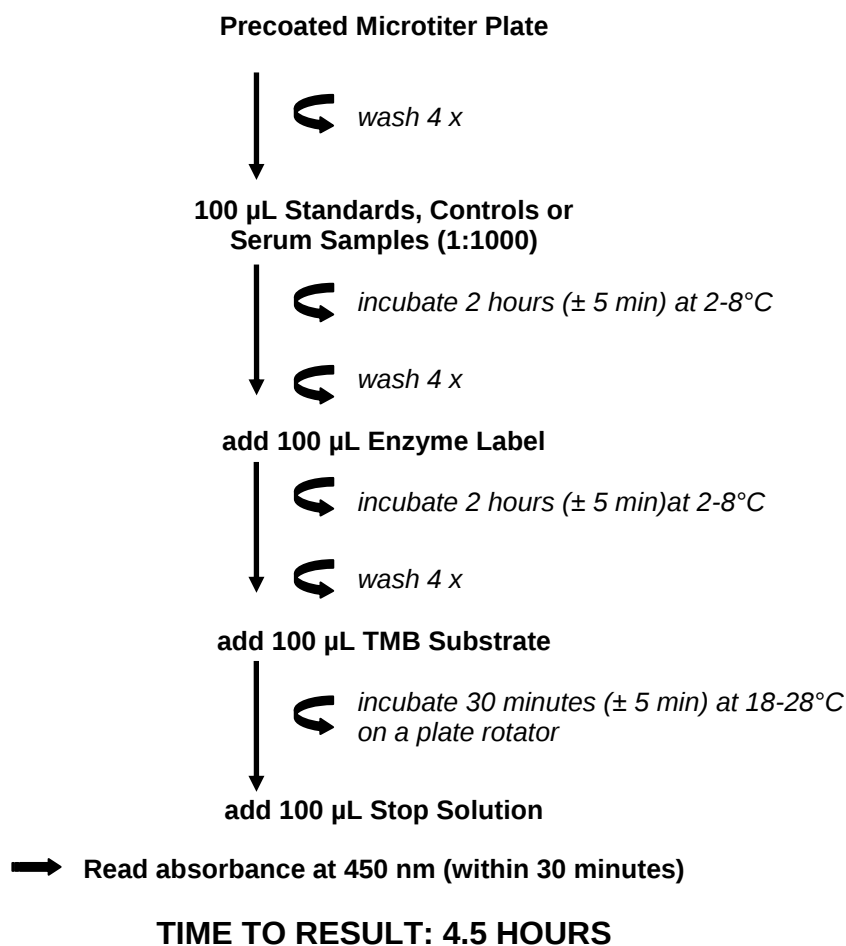
Explications relatives aux tableaux: voir “Résultats” et “Valeurs seuil et Standardisation” et “Caractéristiques de Performance”

Descrizione tavola: cf. “Resultati” e “Valori di Cut-Off e Standardizzazione” e “Caratteristiche di Prestazione”

Explicaciones relativas a las Tablas: ver “Resultados” “Valores de Corte y Estandarización” y “Características de Eficiencia”

1. Quarles, R.H and Weiss, M.D.: Autoantibodies associated with peripheral neuropathy. Muscle Nerve 22, 800-822 (1999).
2. Burger, D. and Steck, A.J.: Neuropathies associated with anti-myelin antibodies. In: Hohlfield, R. (Ed.): Immunology of neuromuscular disease 24, 7-32 (1994).
3. Schmit, P. et al.: Evaluation of four different methods for the detection of anti-myelin autoantibodies. Poster presented at the MEDLAB97, 12th IFCC, Europ Congr of Clin Chem, Basel. Abstract C139 (pp 229-230)

Anti-MAG 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
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone di incubazione Tampón de incubación

Symbol	Explanation
MP	Microtiter Plate Mikrotiter-Platte Microplaque Micropiastra Microplaca
BUF WASH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Tampon de lavage concentré (10x) Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (10x)
CAL A - CAL D	Calibrator A - D Kalibrator A - D Calibrateur A - D Calibratore A - D Calibrador A - D
CONTROL L	Low Control Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
CONTROL H	High Control Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
EL IgM	Enzyme Label IgM Enzymmarker IgM Marqueur enzymatique IgM Marcato enzimatico IgM marcador enzimático IgM
SUBS TMB	TMB Substrate TMB Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato de TMB
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada



Reg. Nr. 22176



Printing Date
2013-01-30