



# anti-SGPG Autoantibodies ELISA

**SGPG: Sulfate-3-Glucuronyl Paragloboside**

EK-SGPG 96 tests

Release Date: 2018-11-16  
Version A1

---

**BÜHLMANN LABORATORIES AG**

Baselstrasse 55  
4124 Schönenbuch, Switzerland  
Tel.: +41 61 487 1212  
Fax: +41 61 487 1234  
info@buhlmannlabs.ch

English	page	3
Deutsch	Seite	7
Français	page	11
Italiano	pagina	15
Espanõl	pàgina	19
Português	pàgina	23



## ENGLISH

### INTENDED USE

The BÜHLMANN anti-SGPG Autoantibodies ELISA is intended for the semi-quantitative *in vitro* diagnostic determination of human IgM-auto-antibodies directed against sulfate-3-glucuronyl paragloboside [SGPG] and sulfate-3-glucuronyl-lactosaminyl-paragloboside [SGLPG]. The test serves as an aid to diagnosis of Paraproteinemic Demyelinating Neuropathy (PDN) in conjunction with other clinical and laboratory findings (1-6).

### PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

The measured absorbance is proportional to the titre of auto-antibodies present in a given sample. The titers of anti-human SGPG auto-antibodies are expressed as ratios of the calibrator and can be assigned to titer categories.

### REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
<b>Microtiter Plate</b> Precoated with bovine SGPG	12 x 8-wells	B-SGPG-MP	Ready to use
<b>Plate Sealer</b>	3 pieces		
<b>Wash Buffer Concentrate (10x)</b> With preservatives	1 bottle 100 mL	B-MAG-WB	Dilute with 900 mL of deionized water
<b>Incubation Buffer</b> With preservatives	1 bottle 100 mL	B-MAG-IB	Ready to use
<b>Calibrator<sup>1</sup></b> Human serum with preservatives	1 vial	B-SGPG-CA	Add 1 mL of Incubation Buffer
<b>Control Low, Medium and High<sup>2</sup></b> Human serum with preservatives	3 vials	B-SGPG-CONSET	Add 1 mL of Incubation Buffer
<b>Enzyme Label IgM</b> Anti-human IgM Ab conjugated to HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 mL	B-SGPG-ELM	Ready to use Blue solution

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
<b>TMB Substrate</b> TMB in citrate buffer	1 vial 11 mL	B-TMB	Ready to use
<b>Stop Solution</b> 0.25 M sulfuric acid	1 vial 11 mL	B-STTS	Ready to use <b>Corrosive agent</b>

Table 1

- The calibrator consists of a diluted positive serum which has been standardized to an internal established reference (see chapter standardization and cut-off).
- Controls low, medium and high contain lot-specific amounts of anti-SGPG antibodies. Refer to the QC data sheet provided with the kit for the appropriate ratios.

### STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

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

Table 2

### MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes with disposable tips capable of pipetting the following volumes: 2 µL, 100 µL and 1000 µL.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 mL cylinder for the dilution of the wash buffer.
- Squeeze bottle for wash buffer or automatic microtiter plate washer.
- Blotting paper.
- Orbital shaker for microtiter plates.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.

### PRECAUTIONS

#### Safety precautions

- Both, calibrator (B-SGPG-CA) and controls (B-SGPG-CONSET) of this kit contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions.
- Stop solution: The stop solution (B-STTS) contains sulfuric acid (0.25 M). The reagent is an irritant to eyes,

skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothes. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.

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

### Technical precautions

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

### SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- The procedure requires <0.1 mL of blood and <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 (no anti-coagulant), avoid haemolysis, leave to clot for one hour at room temperature (18-28 °C), centrifuge for 10-30 minutes at 1000-2000 x g, collect the serum.
- Store serum samples at ≤ -20 °C. Samples are stable for ≥1 year if stored at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Frozen samples should be thawed and mixed thoroughly by gentle swirling or inversion prior to use.
- We recommend freezing aliquots of patient samples in order to avoid repeated freezing / thawing.

---

### ASSAY PROCEDURE

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

*Note: Use cold reagents in steps 3 to 9.*

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

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

10. Add 100 µL of TMB substrate solution to each well.

- Cover plate with a plate sealer, incubate plate on an orbital plate shaker at 400-600 rpm for 30 ± 2 minutes at 18-28 °C. Protect the plate from direct light.
- Add 100 µL of stop solution to all wells. Proceed to step 13 within 30 minutes.
- Read absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.

---

## QUALITY CONTROL

A good understanding of this instruction for use is necessary to obtain reliable results. These will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following the instruction for use. BÜHLMANN strongly recommends testing blank, calibrator, control and samples in duplicate.

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

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

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

---

## STANDARDIZATION

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

---

## RESULTS AND CALCULATION

**Calibrator:** Record absorbance at 450 nm (OD<sub>450</sub>) and subtract the averaged blank value. Average the duplicate values. The ratio of the calibrator is set to a value of 1 (divided by itself).

**Samples and controls:** Record absorbance at 450 nm (OD<sub>450</sub>) for each sample and control well and subtract the averaged blank value. Average the duplicate values. Calculate ratio from the averaged sample absorbance to the averaged absorbance of the calibrator.

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

*Note: Results presented in table 3 are examples. Calibrator and controls must be used in each individual assay.*

---

## LIMITATIONS

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

---

## REFERENCE INTERVALS AND CUT-OFF

### Proposed cut-off ratio

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

14 anti-MAG positive sera were tested. Each serum showed a ratio of 2.4 or higher. The results are listed in table 4. We propose a cut-off ratio of 1.

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

---

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Intra-Assay Precision (Within-Run): 4.9%.** The intra-assay precision was calculated from results of 20 pairs of values from four human sera obtained in a single run (table 5).

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

**Dilution Linearity/Parallelism: 154%.** 13 human serum samples containing high titer of anti-SGPG antibodies were diluted with incubation buffer 1:1000 to 1:128'000, left for one hour at 18-28 °C and subsequently assayed according to the assay procedure. The O/E ratio (observed/expected) was calculated step by step (table 7). It is suggested that the relatively high deviation particularly at high antibody titers in the samples is due to antibody aggregations. In general, pathological sera show strongly elevated antibody titers therefore it has no influence to the positive/negative discrimination.

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

**Detection Limit (LoQ) : <0.15 Ratio.** An anti-SGPG antibody positive serum was subsequently diluted (1:1000-1:100'000). 20 duplicates of each dilution were assayed in a single run. Mean, standard deviation (SD) and coefficient of variation (% CV) were calculated from the absorbance values. We found a ratio <0.145 with a CV of less than 10 % (table 8).

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

1. Neutralization of anti-SGPG auto-antibodies: Two sera with high anti-SGPG titers could be increasingly inhibited

from binding to the microtiter plates coated with SGPG in concentration-dependent manner when preincubated for 16 hours by 4 °C incubation buffer supplemented with increasing amount of SGPG (32 ng to 1.6 µg SGPG in Eq/galactose) prior to testing in the ELISA.

2. Specificity of anti-SGPG auto-antibody binding: Ten sera of medium and high anti-Ganglioside auto-antibody titers (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b) and five negative sera were tested in the anti-SGPG Autoantibodies ELISA. 9/10 of these disease state sera and all negative sera resulted in a ratio lower than 0.6. The positively tested sample was further assayed by thin layer chromatography (TLC) for anti-SGPG and anti-GD1a auto-antibodies. The existence of both kind of antibodies could be confirmed by TLC.

# DEUTSCH

## ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN anti-SGPG Autoantikörper ELISA ist für die halbquantitative *in vitro* Diagnose von human-IgM Autoantikörper vorgesehen, die gegen Sulfat-3-glucuronylparaglobosid [SGPG] und Sulfat-3-glucuronyl-lactosaminyl-paraglobosid [SGLPG] gerichtet sind. Dieser Test unterstützt in Verbindung mit anderen klinischen Ergebnissen und Laborergebnissen die Diagnose einer paraproteinämischen, demyelisierenden Neuropathie (PDN) (1-6).

## PRINZIP DER METHODE

Der anti-SGPG Autoantikörper ELISA verwendet die enzymatisch amplifizierte Immunoassay-Technik vom Sandwichtyp. Die Mikrotiterplatten des Tests werden mit hochreinem SGPG und SGLPG von bovinem *cauda equina* vorbeschichtet. Kalibrator, Kontrollen und Patientenserum werden in den Wells der Mikrotiterplatte inkubiert und alle in der Probe vorliegenden anti-SGPG-Autoantikörper binden an immobilisiertes SGPG/ SGLPG. Nach dem Abwaschen der nichtgebundenen Substanzen, werden die anti-SGPG Autoantikörper mit HRP-konjugierten Antikörpern nachgewiesen, die gegen humanes IgM gerichtet sind. Nach einem zweiten Waschschritt, bei dem die ungebundenen Enzymkonjugat-Antikörper entfernt werden, wird eine Substratlösung, die Tetramethylbenzidin (TMB) enthält, zugegeben. Die blaue Farbe entwickelt sich proportional zur Menge der SGPG-Autoantikörper, die an immobilisiertes SGPG und SGLPG gebunden sind. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer sauren Stopplösung beendet (verdünnte Schwefelsäure) und bewirkt einen Farbumschlag von blau zu gelb. Die Intensität der Farbe wird bei 450 nm gemessen. Die gemessene Absorption ist proportional zum Titer der Autoantikörper, die in der jeweiligen Probe vorhanden sind. Die Titer von anti-human SGPG werden als Verhältnisse des Kalibrators angegeben und können den Titerkategorien zugeordnet werden.

## GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
<b>Mikrotiter-Platte</b> Beschichtet mit SGPG (bovin)	12 x 8 Küvetten mit Halter	B-SGPG- MP	Gebrauchsfertig
<b>Abdeckfolien</b>	3 Stück		
<b>Wasch-Puffer Konzentrat (10x)</b> Mit Konservierungsstoffen	1 Flasche 100 mL	B-MAG- WB	Mit 900 mL deionisiertem H <sub>2</sub> O verdünnen
<b>Inkubations-Puffer</b> Mit Konservierungsstoffen	1 Flasche 100 mL	B-MAG-IB	Gebrauchsfertig
<b>Kalibrator<sup>1</sup></b> Humanes Serum mit Konservierungsstoffen	1 Flasche	B-SGPG- CA	Mit 1 mL Inkubations-Puffer versetzen
<b>Kontrolle tief, medium und hoch<sup>2</sup></b> Humanes Serum mit Konservierungsstoffen	3 Flaschen	B-SGPG- CONSET	Mit 1 mL Inkubations-Puffer versetzen

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
<b>Enzym-Marker IgM</b> Anti-human-IgM Antikörper, an HRP konjugiert, in einem Puffer auf Proteinbasis mit Konservierungs- mitteln	1 Flasche 11 mL	B-SGPG- ELM	Gebrauchsfertig Blaue Lösung
<b>TMB Substrat</b> In Citratpuffer	1 Flasche 11 mL	B-TMB	Gebrauchsfertig
<b>Stopp Lösung</b> 0,25 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 Flasche 11 mL	B- STS	Gebrauchsfertig <b>Korrosiv!</b>

Tabelle 1

- Der Kalibrator besteht aus verdünntem, positivem Serum, welches gegen eine intern etablierte Referenz, standardisiert wurde (siehe Kapitel Standardisierung und Grenzwert).
- Die Kontrollen enthalten Lot-abhängige anti-SGPG Antikörper Mengen. Für Konzentrationsangaben siehe beigelegtes Kontrolldatenblatt.

## LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

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

Tabelle 2

## ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen welche folgende Volumina pipettieren können; 2 µL, 100 µL und 1000 µL.
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Vorbereitung der Verdünnungsproben.
- 1000 mL Zylinder zur Verdünnung des Waschpuffers.
- Spritzflasche für Waschpuffer oder automatischer Mikrotiterplattenwascher.
- Saugfähiges Papier.
- Orbitalschüttler für Mikrotiterplatten.
- Microtiter-Platten-Photometer mit optischem Filter (450 nm).

## VORSICHTSMASSAHMEN

### Sicherheitsmassnahmen

- Kalibrator (B-SGPG-CA) und Kontrollen (B-SGPG-CONSET) enthalten Komponenten humaner Herkunft. Bestandteile humanen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten gemäss Good Laboratory Practice als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- Stopp-Lösung: Die Stopp-Lösung (B-BTS) enthält Schwefelsäure (0,25 M). Das Reagenz reizt die Augen, Haut und Schleimhäute. Berührung mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Nach Berührung mit den Augen oder der Haut, sofort mit reichlich Wasser waschen.
- Reagenzien: Kontakt der Reagenzien mit der Haut, den Augen oder Schleimhäuten vermeiden. Bei Berührung, sofort mit reichlich Wasser waschen; ansonsten kann eine Reizung /Verätzung auftreten.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss der gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

### Technische Vorsichtsmassnahmen

- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Aufgrund des Produktionsprozesses können Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten sein. Sie werden mit dem 1. Waschen (Schritt 3) entfernt und haben keinen Einfluss auf die Ergebnisse.
- Vor dem Start der Analyse Reagenzien vorbereiten. Die in den Schritten 3-9 verwendeten Reagenzien müssen kalt sein (2-8 °C) und beim Pipettieren und Waschen kalt gehalten werden. Das TMB-Substrat muss bei Raumtemperatur (18-28 °C) gehalten werden.
- Schritte 3-9: Für all diese Schritte kalte (2-8 °C) Reagenzien verwenden und diese während des Pipettierens kalt halten. Empfehlung: Waschpuffer am Abend vor der Analyse vorbereiten und über Nacht in den Kühlschrank in den Kühlschrank stellen.
- Waschschritte 3, 6 und 9: Die Waschschritte sind sehr wichtig, um Rückstände, die vom Produktionsprozess herrühren (Schritt 3), sowie alle nichtgebundenen Antikörper (Schritte 6 und 9), von der Mikrotiterplatte zu entfernen.  
→Die Waschschritte immer mit kaltem (2-8 °C) Waschpuffer durchführen.  
→Die Wells müssen nach dem letzten Waschzyklus vollständig entleert werden.
- Schritt 10: Das verwendete TMB Substrat muss auf Raumtemperatur (18-28 °C) gebracht werden.
- Schritt 11: Während der Substratinkubation muss die Platte geschüttelt werden. Die angegebenen rpm (400-600) können nicht direkt auf jeden Schüttler übertragen werden. Die Lösung in den Wells soll in Bewegung gebracht werden, darf aber nicht überschwappen.

- Wird ein Waschautomat eingesetzt, soll der sogenannte „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass das Einfüllen des Waschpuffers erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor das Absaugen gestartet wird.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kit Lots.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu einer Kontamination zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und zwischen den Wells kommt.
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.

## UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

- Dieser Test benötigt <0,1 mL Blut oder <50 µL Serum.
- Lipämische, hämolytische oder ikterische Blutproben sollten nicht verwendet werden. Lipämische Proben können verhindert werden, indem der Patient mindestens 12 Stunden vor der Blutentnahme keine Nahrung zu sich nimmt.
- Die Blutproben in den entsprechenden Röhrchen sammeln (ohne Antikoagulans), Hämolyse vermeiden, eine Stunde lang bei Raumtemperatur (18-28 °C) gerinnen lassen, 10-30 Minuten lang bei Raumtemperatur und 1000-2000 x g zentrifugieren, danach Serum sammeln
- Serumproben bei ≤-20 °C lagern. Die Proben sind ≥1 Jahr haltbar, wenn sie bei ≤-20 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Gefrorene Proben vor dem Gebrauch auftauen und durch leichtes Rühren gut mischen
- Wir empfehlen das Einfrieren von Aliquoten der Patientenproben, um ein wiederholtes Einfrieren/ Auftauen zu vermeiden.

## ARBEITSANLEITUNG

1. Alle zu untersuchenden Patientenproben mit Inkubationspuffer im Verhältnis 1:1000 verdünnen (z. B. 2 µL Serum + 2000 µL Inkubationspuffer). Vor dem Pipettieren in Schritt 4 durch Vortexen gründlich mischen und die verdünnten Proben eine Stunde bei 18-28°C stehen lassen. Proben und rekonstituierte Kalibratoren und Kontrollen für 10 Minuten auf Eis stellen.
2. Einen Mikrotiterplattenrahmen mit ausreichend Streifen für den Ansatz bestücken, um die Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben zu testen. Ungebrauchte Streifen sofort in der mit Dessikator versetzten Aluminiumverpackung verpacken. Kühl lagern.  
*Hinweis: Verwenden Sie in den Schritten 3 bis 9 kalte Reagenzien.*
3. Beschichtete Wells vier Mal mit mindestens 300 µL kaltem! Wasser pro Well waschen. Wells und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen, um die Flüssigkeit vollständig zu entfernen.
- 4a. Je 100 µL Inkubations-Puffer in die Wells A1 und A2 pipettieren (Blank).
- 4b. Je 100 µL Kalibrator in B1+B2 pipettieren.



- 4c. Je 100 µL Kontrolle tief in C1+C2 pipettieren.
  - 4d. Je 100 µL Kontrolle medium in D1+D2 pipettieren.
  - 4e. Je 100 µL Kontrolle hoch in E1+E2 pipettieren.
  - 4f. Je 100 µL der verdünnten Proben im Doppel in die nachfolgenden Wells pipettieren.
  5. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden (±5 Minuten) bei 2-8 °C inkubieren.
  6. Abdeckfolie entfernen. Die Wells entleeren und vier Mal mit jeweils mindestens 300 µL kaltem Waschpuffer pro Well waschen. Wells durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen.
  7. 100 µL Enzymmarker IgM zu jedem Well hinzugeben.
  8. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 2 Stunden (±5 Minuten) bei 2-8 °C inkubieren.
  9. Abdeckfolie entfernen. Die Wells entleeren und vier Mal mit jeweils mindestens 300 µL kaltem Waschpuffer pro Well waschen. Wells durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen.
- Hinweis: TMB-Substratlösung auf Raumtemperatur äquilibrieren (18-28 °C).*
10. 100 µL TMB-Substrat zu jedem Well hinzugeben.
  11. Mikrotiterplatte mit Abdeckfolie abdecken und 30 ± 2 Minuten bei 18-28 °C auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 400-600 U/min inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.
  12. 100 µL Stopplösung zu jedem Well hinzugeben. Innerhalb von 30 Minuten mit Schritt 13 fortfahren
  13. Absorption bei 450 nm mit einem Mikrotiter-Platten-Photometer messen.

---

## QUALITÄTSKONTROLLE

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

BÜHLMANN empfiehlt die Erhebung von Doppelwerten und die Verwendung des daraus berechneten Mittelwerts. Da es keine kommerziell erhältliche anti-SGPG Autoantikörper Kontrolle gibt, wird empfohlen, positive und negative Serumproben als interne Qualitätskontrolle anzuwenden.

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

---

## STANDARDISIERUNG

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

---

## BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

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

Proben und Kontrollen: Absorption bei 450 nm messen. Der mittlere Blank-OD wird vom OD-Mittelwert jeder Probe und Kontrolle subtrahiert. Mittelwerte der Doppelbestimmungen der gemessenen Absorptionen berechnen. Berechnung des Verhältnisses (Ratio) zwischen den Absorptionsmittelwerten der Kontrollen/ Proben und des Absorptionsmittelwerts des Kalibrators.

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

*Hinweis: Die Ergebnisse in Tabelle 3 sind Beispiele. Kalibrator und Kontrollen müssen in jedem individuellen Assay verwendet werden.*

---

## EINSCHRÄNKUNGEN DER LEISTUNGSMERKMALE

1. Die Ergebnisse sollten in Verbindung mit der Anamnese des Patienten und weiteren diagnostischen Tests verwendet werden.
2. Der anti-SGPG Autoantikörper ELISA wurde nicht für Plasmaphereseproben getestet.

---

## REFENZINTERVALLE UND CUT-OFF RATIO

### Vorgeschlagenes Cut-off Verhältnis (Ratio)

Das Normalwertverhältnis von anti-SGPG wurde anhand von 200 Blutproben von asymptomatischen freiwilligen Blutspendern, (49 weiblich, 151 männlich im Alter zwischen 18-70 Jahren) welche entsprechend der Arbeitsanleitung getestet wurden, ermittelt. Nur 1/200 (0,5 %) Proben zeigte ein Verhältnis (Ratio) >1. Sechs Seren zeigten ein Verhältnis zwischen 0,5 und 0,6, während 193/200 (96,5 %) Seren ein Verhältnis unter 0,5 zeigten.

14 anti-MAG positive Seren wurden getestet. Jedes dieser Seren wies ein Verhältnis 2,4 oder höher auf. Die Resultate sind in Tabelle 4 dargestellt. BÜHLMANN schlägt die Verwendung eines Cut-off von 1 vor.

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

Spezifität des ELISA von 90,0 % und 97,1 %. (persönliche Kommunikation mit Dr. C. Caudie, Lyon F.).

---

## LEISTUNGSMERKMALE

**Intra-Assay Präzision (Within-Run): 4,9 %.** Die intra-assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung von vier unterschiedlichen Seren im gleichen Ansatz (Tabelle 5).

**Inter-Assay Präzision (Run-to-Run): 10,0 %.** Die inter-assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung von sechs unterschiedlichen Seren in 20 verschiedenen Ansätzen (Tabelle 6).

**Verdünnunglinearität: 154 %.** 13 Humansenen mit erhöhten anti-SGPG Titer wurden mit Inkubations-Puffer 1:1000 bis 1:128'000 verdünnt und für eine Stunde bei 18-28 °C stehen gelassen. Die Verdünnungen wurden danach entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Das Verhältnis O/E (beobachtet/erwartet) wurde Schritt für Schritt berechnet (Tabelle 7). Es wird vermutet, dass die relativ hohen Abweichungen der Proben aufgrund von Antikörper Aggregaten zustande kommen. Im Allgemeinen enthalten aber pathologische Seren sehr hohe Autoantikörper Titer, so dass dies keinen Einfluss auf die positiv/negativ Diskriminierung hat.

**Nachweisgrenze (LoB) : <0,01 Ratio.** 20 Doppelansätze mit Inkubations-Puffer wurden gleichzeitig angesetzt. Mittelwert und Standardabweichung wurden für die Absorptionswerte (OD) berechnet. Nach Abzug der Absorptionswerte des Blanks und Kalkulation des Verhältnisses wurde ein Wert von 0,006 erhalten.

**Nachweisgrenze (LoQ) : <0,15 Ratio.** Ein anti-SGPG Antikörper positives Serum wurde fortlaufend verdünnt (1:1000-1:100'000). 20 Doppelansätze wurden gleichzeitig angesetzt. Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient (%CV) wurde von den Absorptionswerten berechnet. Ein CV von 10 % wurde bei einem Ratio Wert von 0,145 gefunden (Tabelle 8).

**Spezifität:** Zwei unterschiedliche Experimente wurden durchgeführt, um die Spezifität des anti-SGPG Autoantikörper ELISA zu ermitteln:

1. Neutralisierung von anti-SGPG Autoantikörper: Durch die Zugabe von freiem SGPG zu zwei Seren mit hohem anti-SGPG Titer, konnte die Bindung an die mit SGPG beschichtete Mikrotiterplatte auf eine konzentrationsabhängige Weise inhibiert werden. Dafür wurden aufsteigende Konzentrationen (32 ng bis 1,6 µg SGPG in Eq/Galaktose) zu den Seren gegeben und vor dem Messen im ELISA für 16 Stunden bei 4 °C vorinkubiert.

2. Spezifität der anti-SGPG Autoantikörper Bindung: Zehn Seren mit mittel bis hohen anti-Gangliosid Autoantikörper Titer (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b und GQ1b) sowie fünf negative Seren wurden im anti-SGPG Autoantikörper ELISA getestet. 9/10 positiven, sowie alle negativen Seren ergaben ein Ratio (Verhältnis) von <0,6. Das als positiv getestete Serum wurde in einer Dünnschicht-chromatographie auf anti-SGPG und anti-GD1b Autoantikörper analysiert und als Doppelpositiv bestätigt.

# FRANCAIS

## DOMAINE D'UTILISATION

Le test ELISA Autoanticorps anti-SGPG de BÜHLMANN est destiné à la détermination diagnostique semi-quantitative *in vitro* des auto-anticorps à IgM humaine dirigés contre le sulfate-3-glucuronyl-paragloboside [SGPG] et le sulfate-3-glucuronyl-lactosaminyl-paragloboside [SGLPG]. Le test aide à diagnostiquer la neuropathie démyélinisante paraprotéïnémique (NDP) en conjonction avec d'autres résultats cliniques et analytiques (1-6).

## PRINCIPE DU DOSAGE

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

L'absorbance mesurée est proportionnelle au titre d'auto-anticorps présents dans un échantillon donné. Les titres des auto-anticorps anti-SGPG humain sont exprimés sous forme de rapports du calibrateur et peuvent être assignés à des catégories de titres.

## REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
<b>Microplaque</b> 96 puits, précoâtée-SGPG d'origine bovine	12 barrettes de 8 puits avec support	B-SGPG-MP	Prête à l'emploi
<b>Film adhésif</b>	3		
<b>Tampon de lavage concentré (10x)</b> Avec conservateurs	1 flacon 100 mL	B-MAG-WB	A reconstituer avec 900 mL d'eau déionisée
<b>Tampon d'incubation</b> Avec conservateurs	1 flacon 100 mL	B-MAG-IB	Prêt à l'emploi
<b>Calibrateur</b> <sup>1</sup> Sérum humain avec conservateurs	1 flacon	B-SGPG-CA	A reconstituer avec 1 mL de tampon d'incubation
<b>Contrôles bas, medium et élevé</b> <sup>2</sup> Sérum humain avec conservateurs	3 flacons	B-SGPG-CONSET	A reconstituer avec 1 mL de tampon d'incubation

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

Tableau 1

- 1) Le calibrateur est produit à partir d'un échantillon positif dilué et standardisé par rapport à une référence interne (cf. paragraphes Standardisation et Valeur Seuil).
- 2) Les contrôles bas, medium et élevé contiennent des quantités d'anticorps anti-SGPG spécifiques à chaque lot. Il convient de se référer aux limites de confiance communiquées avec chaque lot de production.

## STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

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

Tableau 2

## MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision capables de pipeter les volumes suivants 2 µL, 100 µL et 1000 µL avec pointes jetables.
- Tubes en polystyrène ou polypropylène jetables, pour la préparation des dilutions.
- Eprouvette graduée de 1000 mL pour la préparation du tampon de lavage à partir du concentré.
- Flacon souple pour tampon de lavage ou dispositif de lavage automatique de microplaques.
- Papier absorbant.
- Agitateur orbital pour microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

## PRECAUTIONS

### Précautions de sécurité

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

### Précautions techniques

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

(400-600) ne s'appliquent pas à tous les agitateurs de microplaques. La solution doit s'agiter dans les puits mais sans déborder.

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

## PRELEVEMENT 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 (pas d'anticoagulant) en évitant l'hémolyse, laisser coaguler à température ambiante (18-28 °C) pendant 1 heure, centrifuger à environ 1000-2000 x g durant 10-30 minutes et recueillir le sérum
- Conserver les échantillons de sérum à ≤-20 °C. Les échantillons se conservent jusqu'à 1 année s'ils sont stockés à ≤-20 °C. Éviter les cycles de congélation et de décongélation. Avant utilisation, les échantillons congelés doivent être décongelés et homogénéisés en les agitant doucement ou en inversant le tube de manière répétée.
- Nous recommandons de congeler les prélèvements d'échantillons de patient pour éviter de répéter des cycles de congélation/décongélation.

## PROCEDURE

1. Diluer tous les échantillons de patient à analyser au 1/1000e avec du tampon d'incubation (ex. 2 µL de sérum + 2000 µL de tampon d'incubation). Mélanger vigoureusement au vortex et laisser les échantillons dilués pendant une heure à 18-28 °C. Placer les échantillons ainsi que les calibrateurs et contrôles reconstitués pendant 10 minutes sur de la glace avant le pipetage de l'étape 4.
2. Préparer un cadre de plaque avec le nombre de barrettes adéquat pour tester les calibrateurs, les contrôles et les échantillons de patient. Resceller immédiatement les barrettes restantes dans le sachet film contenant le dessicateur. Conserver au réfrigérateur.

*Remarque: Utiliser des réactifs froids dans les étapes 3 à 9.*

3. Laver les puits revêtus quatre fois avec au moins 300 µL de tampon de lavage froid! par puits. Vider les puits et tapoter fermement la plaque sur le papier absorbant pour éliminer complètement le liquide restant.
  - 4a. Distribuer 100 µL de tampon d'incubation (« blanc ») en double dans les puits A1 et A2.
  - 4b. Distribuer 100 µL de calibrateur en double dans B1+B2.
  - 4c. Distribuer 100 µL de contrôle bas en double dans C1+C2.
  - 4d. Distribuer 100 µL de contrôle medium en double dans D1+D2.
  - 4e. Distribuer 100 µL de contrôle élevé en double dans E1+E2.
  - 4f. Distribuer 100 µL d'échantillons dilués en double dans les puits suivants
  5. Couvrir la microplaque à l'aide du film adhésif fourni et incubé à 2-8 °C pendant 2 heures (±5 minutes).
  6. Retirer le film adhésif de la plaque. Vider puis laver les puits quatre fois avec au moins 300 µL de tampon de lavage froid (2-8 °C) par puits. Vider les puits et frapper fermement la plaque contre le papier absorbant pour éliminer complètement le tampon de lavage.
  7. Ajouter 100 µL de marqueur enzymatique dans chaque puits.
  8. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incubé à 2-8 °C pendant 2 heures (±5 minutes).
  9. Retirer le film adhésif de la plaque. Vider puis laver les puits quatre fois avec au moins 300 µL de tampon de lavage froid (2-8 °C) par puits. Vider les puits et frapper fermement la plaque contre le papier absorbant pour éliminer complètement le tampon de lavage.
- Remarque: Ajuster la solution de substrat TMB à température ambiante (18-28 °C).*
10. Ajouter 100 µL de solution de substrat dans chaque puit.
  11. Recouvrir la plaque d'un film adhésif, incubé la plaque sur un agitateur de plaques orbital à 400-600 rpm pendant 30 ± 2 minutes à 18-28 °C. Protéger la plaque de la lumière directe.
  12. Ajouter 100 µL de solution stop dans chaque puits. Passer à l'étape 13 dans les 30 minutes qui suivent.
  13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

## CONTROLE QUALITE

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

Nous recommandons fortement de travailler en duplicat (blanc, calibrateur, contrôles et échantillons).

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

Tous les contrôles doivent être inclus dans les intervalles de confiance établis. Les intervalles de confiance pour les

contrôles sont spécifiques au lot et inscrites sur la fiche de données de QC fournie avec le kit.

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

## STANDARDISATION

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

## RESULTATS

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

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

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

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

## LIMITES

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

## INTERVALLES DES REFERENCES ET VALEURS SEUIL (CUT-OFF)

### Cut-off/ Valeur seuil proposé(e)

Le « background ratio » d'anti-SGPG a été défini à partir du dosage, selon la procédure standard, des échantillons de 200 donneurs de sang asymptomatiques (49 femmes et 151 hommes âgés de 18 à 70 ans). Seul 1 échantillon sur les 200 testés (0,5 %) a présenté un ratio >1. Six échantillons ont présenté un ratio compris entre 0,5 et 0,6, alors que 193 échantillons sur 200 (96,5 %) ont présenté des valeurs inférieures à 0,5.

14 échantillons sériques anti-MAG positifs ont également été analysés. Leurs ratios étaient tous ≥2,4. Les résultats

se trouvent en tableau 4. En conséquence, nous proposons une valeur seuil (cut-off) de 1.

De plus, au cours d'une étude externe, cette valeur seuil a été vérifiée sur 223 échantillons sériques de patients chez lesquels une neuropathie était suspectée. 178 échantillons furent testés au moyen de la technique de détection (TLC), chromatographie sur couche mince, méthode de référence, décrite dans la littérature (4). 99/110 échantillons TLC positifs le furent également avec du test ELISA Autoanticorps anti-SGPG. 66/68 échantillons TLC négatifs le furent également avec l'ELISA. Ces données permettent de définir une sensibilité de 90,0 % et une spécificité de 97,1 % pour l'ELISA (communication personnelle Dr C. Caudie, Lyon, F.).

---

## CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

**Précision intra-essai: 4,9 %.** La précision intra-essai a été calculée à partir des mesures de 20 duplicats de chaque échantillon lors d'un seul et même essai (tableau 5).

**Précision inter-essai: 10,0 %.** La précision inter-essai a été calculée à partir des résultats de 20 duplicats de 6 échantillons sériques humains lors de 20 essais différents (tableau 6).

**Linéarité de dilution/ parallélisme: 154 %.** 13 échantillons sériques humains présentant des taux élevés d'auto-anticorps anti-SGPG élevés furent dilués du 1000<sup>ème</sup> au 128'000<sup>ème</sup> (de 1:1000 à 1:128'000), incubés durant une heure à 18-28 °C puis dosés selon le protocole standard. Le ratio VO/VA (valeur observée/valeur attendue) a été calculé étape par étape (tableau 7). Il est probable que la déviation importante observée pour environ 50 % des échantillons soit due à l'agrégation d'anticorps. En général, les échantillons pathologiques présentent des taux d'auto-anticorps très élevés. Cette déviation n'a donc pas d'influence sur l'interprétation des résultats.

**Limite de blanc (LoB) : <0,01 Ratio.** 20 duplicats du tampon d'incubation ont été mesurés lors d'un même essai. La moyenne et la déviation standard ont été calculées pour les valeurs d'absorbance (DO). Après soustraction de l'absorbance des « blancs » et calcul des ratios, la valeur de 0,006 a été obtenue.

**Limite de quantification (LoQ) : <0,15 Ratio.** Un échantillon sérique anti-SGPG positif a été dilué (1:1000 à 1:100'000). 20 duplicats de chaque dilution ont été testés au cours d'un même essai. La moyenne, l'écart type (SD) et le coefficient de variation (%CV) des valeurs d'absorbance ont été calculés. Un ratio <0,145 a été obtenu, avec un CV inférieur à 10 % (tableau 8).

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

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

2. Spécificité de liaison des auto-anticorps anti-SGPG: Dix échantillons sériques présentant des taux moyens à élevés d'auto-anticorps anti-Ganglioside (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b et GQ1b) ainsi que cinq échantillons sériques négatifs furent analysés à l'aide du test autoanticorps anti-SGPG ELISA. Neuf échantillons sur les dix pathologiques ainsi que les cinq échantillons négatifs ont présenté des ratios inférieurs à 0,6. Sur le seul échantillon positif, une recherche d'auto-anticorps anti-SGPG et anti-GD1a a été effectuée par TLC (chromatographie sur couche mince). La présence des deux types d'auto-anticorps a été confirmée par cette méthode.

**USO**

Il dosaggio Autoanticorpi anti-SGPG ELISA BÜHLMANN è destinato alla determinazione diagnostica semiquantitativa *in vitro* di autoanticorpi IgM umani diretti contro la solfato-3-glucuronil paragloboside [SGPG] e la solfato-3-glucuronil-lactosaminil-paragloboside [SGLPG]. Il test serve come ausilio nella diagnosi della neuropatia demielinizante paraproteinemica (PDN) in aggiunta ad altri risultati clinici e di laboratorio (1-6).

**PRINCIPIO DEL DOSAGGIO**

Il dosaggio Autoanticorpi anti-SGPG ELISA utilizza una tecnica di immunodosaggio tipo sandwich amplificato enzimaticamente. Le micropiastre del test sono coattate con SGPG e SGLPG di *cauda equina* bovina altamente purificate. Calibratore, controlli e sieri dei pazienti sono incubati nei pozzetti di microtitolazione e gli autoanticorpi anti-SGPG presenti nei campioni si legano alla SGPG/SGLPG immobilizzata. Dopo l'eliminazione mediante lavaggio delle sostanze libere, gli autoanticorpi anti-SGPG vengono rilevati con anticorpi contro le IgM umane marcati con perossidasi di rafano (HRP). Dopo un secondo lavaggio, nel quale viene rimosso il marcatore enzimatico libero, viene aggiunta una soluzione di substrato contenente tetrametilbenzidina (TMB). Si sviluppa un colore blu proporzionale alla quantità di autoanticorpi anti-SGPG legati alle SGPG e SGLPG immobilizzate. Lo sviluppo di colore viene interrotto mediante l'aggiunta di una soluzione bloccante acida (acido solforico diluito) che vira la soluzione da blu a giallo. L'intensità del colore viene misurata a 450 nm.

L'assorbanza misurata è proporzionale al titolo di autoanticorpi presenti in un dato campione. I titoli di autoanticorpi anti-SGPG umana sono espressi come rapporti del calibratore e possono essere assegnati a categorie di titolo.

**REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE REAGENTI**

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
<b>Micropiastre</b> 96 pozzetti precoattati con SGPG bovina	Strip da 12 x 8-pozzetti con supporto	B-SGPG-MP	Pronto all'uso
<b>Foglio sigillante per la piastra</b>	3 fogli		
<b>Tampone di lavaggio concentrato (10x)</b> Con conservanti	1 flacone 100 mL	B-MAG-WB	Diluire con 900 mL di acqua deionizzata
<b>Tampone di incubazione</b> Con conservanti	1 flacone 100 mL	B-MAG-IB	Pronto all'uso
<b>Calibratore<sup>1</sup></b> Siero umano con conservanti	1 flacone	B-SGPG-CA	Aggiungere 1 mL di tampone di incubazione
<b>Controllo basso, medio e alto<sup>2</sup></b> Siero umano con conservanti	3 flaconi	B-SGPG-CONSET	Aggiungere 1 mL di tampone di incubazione

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
<b>Marcato enzimatico IgM</b> Anticorpo anti-IgM umane coniugato a HRP in un tampone a base proteica con conservanti.	1 flacone 11 mL	B-SGPG-ELM	Pronto all'uso Soluzione Blu
<b>Substrato TMB</b> TMB in un tampone citrato	1 flacone 11 mL	B-TMB	Pronto all'uso
<b>Soluzione stoppante</b> 0,25 M di acido solforico	1 flacone 11 mL	B- STS	Pronto all'uso <b>Agente corrosivo</b>

Tabella 1

- Il calibratore è composto da un siero positivo diluito standardizzato secondo un riferimento interno stabilito (vedi capitolo standardizzazione e cut-off).
- Il controllo basso, medio ed alto contengono quantitativi lotto-specifici di anticorpi anti-SGPG. Fare riferimento ai dati di QC forniti con il kit per i valori corrispondenti.

**CONSERVAZIONE ED EMI-VITA DEI REAGENTI**

Reagenti Sigillati / (Non aperti)	
Tutti i componenti del kit sigillati/ non aperti sono stabili a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sulle etichette.	
Reagenti Aperti / Ricostituiti	
Micropiastre	Riporre le strip non utilizzate immediatamente nella busta di alluminio che contiene il desiccante e risigillarle completamente chiudendo la zip. Conservare fino a 2 mesi a 2-8 °C.
Tampone di lavaggio diluito	Conservare fino a 2 mesi a 2-8 °C.
Calibratore	Conservare fino a 2 mesi a -20 °C
Controlli	
Tampone di incubazione	Conservare a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sulle etichette.
Marcato enzimatico	
Substrato TMB	
Soluzione bloccante	Conservare a 18-28 °C fino alla data di scadenza indicata sulle etichette.

Tabella 2

**MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI**

- Pipette di precisione con puntali monouso in grado di pipettare i seguenti volumi; 2 µL, 100 µL e 1000 µL.
- Provette monouso di polistirene o polipropilene per la preparazione delle diluizioni del campione.
- Beuta a cilindro da 1000 mL per la diluizione del tampone di lavaggio concentrato
- Flacone dosatore per il tampone di lavaggio o lavatore automatico per micropiastre.
- Carta assorbente.
- Agitatore orbitale per micropiastre.
- Letto di micropiastre per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm.



## 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.
- Soluzione stoppante: La soluzione stoppante (B-ST5) contiene acido solforico (0,25 M). Il reagente è irritante per gli occhi, per la pelle e per le membrane mucose. Evitare il contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti. In caso di contatto con gli occhi o con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua.
- Reagenti: Evitare il contatto dei reagenti con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondanti quantità di acqua, in caso contrario si possono sviluppare irritazione/ ustioni.
- In merito alle precauzioni adeguate per lo smaltimento di reagenti del kit, consigliamo vivamente di consultare prima le normative locali speciali del proprio paese.

### Precauzioni tecniche

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

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

## PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

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

## DOSAGGIO

1. Diluire tutti i campioni del paziente da analizzare 1:1000 con tampone di incubazione (ad es.: 2 µL di siero + 2000 µL di tampone di incubazione). Miscelare accuratamente con il vortex e lasciare i campioni diluiti per un'ora a 18-28 °C. Mettere i campioni e i calibratori ricostituiti e i controlli per 10 minuti in ghiaccio prima di pipettarli nel punto 4.
2. Preparare il modulo di supporto per micropiastre con il numero necessario di strip per analizzare i calibratori, i controlli e i campioni del paziente. Risigillare immediatamente le strip rimanenti nella busta di alluminio assieme alle confezioni di essiccante. Conservarle refrigerate.  
*Nota: Usare reagenti freddi nei punti da 3 a 9.*
3. Lavare i pozzetti rivestiti quattro volte usando almeno 300 µL di tampone di lavaggio freddo! per pozzetto. Svotare i pozzetti e picchiettare fermamente la piastra su carta assorbente per rimuovere completamente il liquido rimanente.
- 4a. Dispensare 100 µL di tampone di incubazione in duplicato nei pozzetti A1+A2 (bianco campione).
- 4b. Dispensare 100 µL del calibratore in duplicato nei pozzetti B1+B2.



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

## CONTROLLO DI QUALITÀ

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

BÜHLMANN consiglia caldamente di testare il bianco, il calibratore, i controlli ed i campioni in duplicato.

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

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

Le caratteristiche di prestazione devono rientrare nei limiti stabiliti. Se tali caratteristiche non sono conformi ai limiti stabiliti e la ripetizione del test esclude problemi di manipolazione, controllare i seguenti aspetti: i) tutti i reagenti utilizzati nei punti 3-10, sono stati tenuti a 2-8 °C?

ii) accuratezza delle pipette, dei termometri e dei cronometri, iii) impostazioni del lavatore e del lettore ELISA, iv) data di scadenza dei reagenti v) condizioni di conservazione e di incubazione vi) colore della soluzione di substrato TMB (deve essere incolore) vii) purezza dell'acqua.

## STANDARDIZZAZIONE

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

## RESULTATI E CALCOLO

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

**Campioni e controlli:** Memorizzare l'assorbanza a 450 nm (OD<sub>450</sub>) per ciascun campione e pozzetto del controllo e sottrarre il valore medio del bianco campione. Fare la media dei valori duplicati. Calcolare il rapporto tra l'assorbanza media del campione e l'assorbanza media del calibratore.

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

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

## LIMITI DELLE PRESTAZIONI

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

## INTERVALLOS DE REFERENZIA E CUT-OFF

### Rapporto di cut-off suggerito

Il rapporto di background del kit anti-SGPG è stato determinato utilizzando 200 campioni di sangue da donatori volontari asintomatici (49 femmine, 151 maschi di età compresa tra 18 e 70 anni) che sono stati testati secondo la procedura del dosaggio. Soltanto 1/200 (0,5 %) dei campioni hanno presentato un rapporto di >1. Sei sieri hanno presentato un rapporto tra 0,5 e 0,6, mentre 193/200 (96,5 %) sieri hanno presentato un rapporto al di sotto di 0,5.

Sono stati testati 14 sieri positivi anti-MAG. Ciascun siero ha presentato un rapporto di 2,4 o superiore. I risultati sono elencati in tabella 4. Quindi proponiamo un rapporto di cut-off di 1.

Inoltre, in uno studio esterno comprendente 223 sieri di pazienti affetti da una sospetta neuropatia, è stato verificato il cut-off più sopra proposto. Sono stati testati 178 sieri con il metodo di riferimento (TLC) cromatografia a strato sottile descritto in letteratura (4). 99/110 sieri positivi con TLC sono stati testati positivi con il kit autoanticorpi

anti-SGPG ELISA. 66/68 sieri negativi con TLC sono stati testati negativi con ELISA. Questo risultato ha comportato una sensibilità ed una specificità dell'ELISA del 90,0 % e del 97,1 % rispettivamente (comunicazione personale del Dr. C.Caudie, Lyon, F.).

GD1a. L'esistenza di entrambi i tipi di anticorpi può essere confermata con TLC.

---

## CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

**Precisione Intra-Dosaggio (Intra-Seduta): 4,9 %.** La precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori ottenuti da quattro sieri umani in un'unica seduta (tabella 5).

**Precisione Inter-Dosaggio (Da Seduta a Seduta): 10,0 %.** La precisione inter-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori ottenuti da sei sieri umani in 20 sedute diverse (tabella 6).

**Linearità/Parallelismo di Diluizione: 154 %.** Tredici campioni di siero umano contenenti titoli elevati di anticorpi anti-SGPG sono stati diluiti con tampone di incubazione da 1:1000 a 1:128.000, lasciati per un'ora a 18-28 °C e successivamente dosati secondo la procedura del dosaggio. Il rapporto O/A (osservati/attesi) è stata calcolata passo passo (tabella 7). Si ritiene che la deviazione relativamente alta, osservata in particolare in presenza di alti titoli anticorpali nei campioni, sia dovuta ad aggregazione degli anticorpi. In generale, i sieri patologici presentano un titolo molto elevato di auto-anticorpi, quindi non influenzano la discriminazione tra positivi e negativi.

**Limite del Bianco (LoB) : <Rapporto 0,01.** 20 duplicati del tampone di incubazione sono stati dosati in un'unica seduta. La deviazione media e quella standard (SD) sono state calcolate a partire dai valori di assorbenza (OD). Dopo aver sottratto il valore di assorbenza del bianco campione ed aver calcolato il rapporto è stato ottenuto un valore di 0,006.

**Limite di Quantificazione (LoQ) : <Rapporto 0,15.** Un siero positivo per gli auto-anticorpi anti-SGPG è stato successivamente diluito (1:1000–1:100'000). In un'unica seduta sono stati dosati 20 duplicati di ciascuna diluizione. La media, la deviazione standard (SD) ed il coefficiente di variazione (%CV) sono stati calcolati dai valori di assorbenza. E' stato riscontrato un rapporto <0,145 con un CV inferiore al 10 % (tabella 8).

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

1. Neutralizzazione degli auto-anticorpi anti-SGPG: due sieri con titoli elevati di anti-SGPG potrebbero essere ulteriormente inibiti dal legame alle micropiastre coattare con SGPG in maniera dipendente dalla concentrazione se preincubati per 16 ore a 4 °C con tampone di incubazione a cui sono state aggiunte concentrazioni crescenti di SGPG (32 ng to 1,6 µg SGPG in Eq/galattosio) prima di effettuare il test in ELISA.

2. Specificità del legame degli auto-anticorpi anti-SGPG: Dieci sieri con titoli medi ed alti di auto-anticorpi anti-Ganglioside (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b and GQ1b) e cinque sieri negativi sono stati testati con il dosaggio autoanticorpi anti-SGPG ELISA. 9/10 di questi sieri positivi per la patologia e tutti i sieri negativi hanno prodotto un rapporto inferiore a 0,6. Il campione testato come positivo è stato ulteriormente dosato utilizzando la cromatografia a strato sottile (TLC) per gli auto-anticorpi anti-SGPG ed anti-

**USO ESPECÍFICO**

La prueba BÜHLMANN anti-SGPG Autoantibodies ELISA está destinada a la determinación diagnóstica *in vitro* semicuantitativa de autoanticuerpos IgM humanos dirigidos contra el sulfato-3-glucuronil paraglobósido [SGPG] y el sulfato-3-glucuronil-lactosaminil-paraglobósido [SGLPG]. La prueba sirve como ayuda, junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio, en el diagnóstico de la neuropatía desmielinizante asociada a paraproteínas (PDN) (1-6).

**PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO**

La prueba anti-SGPG Autoantibodies ELISA utiliza la técnica de inmunoensayo de tipo sándwich con amplificación enzimática. Las placas de microtitulación de la prueba vienen previamente recubiertas con SGPG y SGLPG altamente purificados procedentes de *cauda equina* de bovino. El calibrador, los controles y los sueros de paciente se incuban en los pocillos de microtitulación, con lo que los auto-anticuerpos anti-SGPG presentes en las muestras se unen al SGPG/ SGLPG inmovilizado. Tras un lavado para retirar las sustancias no unidas, los auto-anticuerpos anti-SGPG se detectan con anticuerpos frente a IgM humana marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un segundo paso de lavado en el que se retira el marcador enzimático no unido, se añade una solución sustrato que contiene tetrametilbencidina (TMB). Se desarrolla así una coloración azul proporcional a la cantidad de autoanticuerpos anti-SGPG unidos al SGPG y el SGLPG inmovilizados. El desarrollo de color se detiene añadiendo una solución de parada ácida (ácido sulfúrico diluido) que hace virar la solución azul hacia el amarillo. Se mide entonces la intensidad del color a 450 nm. La absorbancia medida es proporcional al título de auto-anticuerpos presente en una determinada muestra. Los títulos de auto-anticuerpos anti-SGPG humano se expresan como relaciones con respecto al calibrador y pueden asignarse a categorías de título.

**REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN**

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
<b>Microplaca</b> 96 pocillos recubiertos con SGPG bovino	12 tiras de 8 pocillos con soporte	B-SGPG-MP	Listo para usar
<b>Sellador de placas</b>	3 unidades		
<b>Tampón de lavado concentrado (10x)</b> Con conservantes	1 botella 100 mL	B-MAG-WB	Diluir con 900 mL de agua desionizada
<b>Tampón de incubación</b> Con conservantes	1 botella 100 mL	B-MAG-IB	Listo para usar
<b>Calibrador<sup>1</sup></b> Suero humano con conservantes	1 vial	B-SGPG-CA	Añadir 1 mL de tampón de incubación
<b>Controles bajo, medio y alto<sup>2</sup></b> Suero humano con conservantes	3 viales	B-SGPG-CONSET	Añadir 1 mL de tampón de incubación

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
<b>Marcador de enzima IgM</b> Anticuerpo anti-IgM humana conjugado con HRP en un tampón proteico con conservantes	1 vial 11 mL	B-SGPG-ELM	Listo para usar Solución azul
<b>Substrato TMB</b> TMB en tampón citrato	1 vial 11 mL	B-TMB	Listo para usar
<b>Solución de parada</b> Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 11 mL	B- STS	Listo para usar <b>Agente corrosivo</b>

Tabla 1

- 1) El calibrador consiste en una muestra diluida de suero positivo que se ha estandarizado según una referencia interna establecida (véase el capítulo sobre estandarización y corte).
- 2) Los controles bajo, medio y alto contienen cantidades de anticuerpos anti-SGPG específicas del lote. Consulte la hoja de datos de control de calidad que viene con el kit para ver los respectivos cocientes.

**ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS**

Reactivos Sellados / Sin Abrir	
Todos los componentes del kit sellados/sin abrir permanecen estables a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.	
Reactivos Abiertos / Reconstituídos	
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.
Calibrador	Almacénese hasta 2 meses a -20 °C.
Controles	
Tampón de incubación	Almacénese a entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas..
Marcador de enzima	
Substrato de TMB	
Solución de parada	Almacénese a entre 18 y 28 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.

Tabla 2

**MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS**

- Pipetas de precisión con puntas desechables capaces de pipetear los siguientes volúmenes; 2 µL, 100 µL y 1000 µL.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro de 1000 mL para la dilución del tampón de lavado concentrado.
- Frasco lavador para el tampón de lavado o lavador de placas de microtitulación automático.
- Papel secante.
- Agitador orbital para placas de microtitulación.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

## PRECAUCIONES

### Precauciones de seguridad

- El calibrador (B-SGPG-CA) y los controles (B-SGPG-CONSET) de este kit contienen componentes de origen humano. Aunque se ha comprobado y encontrado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, tomando las precauciones adecuadas.
- Solución de parada: La solución de parada (B-ST5) contiene ácido sulfúrico (0,25 M). El reactivo es irritante para los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evitar el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Tras un contacto con los ojos o la piel, lavar inmediatamente con abundante agua.
- Reactivos: Evitar el contacto de los reactivos con la piel, los ojos o las membranas mucosas. Si se produce el contacto, lavar inmediatamente con cantidades generosas de agua; de lo contrario, se pueden producir irritación o quemaduras.
- Las soluciones/reactivos no utilizados deben eliminarse según la normativa local.

### Precauciones técnicas

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Residuos pueden formarse en los pocillos durante el proceso de la producción. Ellos están eliminados completamente durante lavar los pocillos y no tienen ninguna influencia en los resultados (véase a punto 3 de la instrucción de uso).
- Prepare los reactivos antes de iniciar el procedimiento de ensayo. Los reactivos empleados en los pasos nº 3 a 9 deben estar fríos (entre 2 y 8 °C) y mantenerse fríos durante el pipeteo y el lavado. Ponga el sustrato de TMB a temperatura ambiente (entre 18 y 28 °C).
- Pasos 3 a 9: Utilice reactivos fríos (entre 2 y 8 °C) en todos estos pasos y manténgalos fríos durante el pipeteo. Recomendación: Prepare el tampón de lavado la tarde anterior a la realización del ensayo y déjelo en el frigorífico hasta el día siguiente.
- Pasos de lavado nº 3, 6 y 9: Los pasos de lavado son cruciales para retirar los residuos presentes en los pocillos de la placa de microtitulación como resultado del proceso de producción (paso nº 3) así como cualquier anticuerpo no unido (pasos nº 6 y 9).  
→ Realice siempre los pasos de lavado con tampón de lavado frío (entre 2 y 8 °C).  
→ Cerciérese de vaciar los pocillos totalmente después del último ciclo que de lavado.
- Paso 10: Cerciérese de utilizar el sustrato de TMB que fue equilibrado a la temperatura ambiente (18-28 °C).
- Paso 11: Agite las placas de microtitulación bien durante la incubación con el sustrato. Las RPM dadas

(400-600) no solicitan cada rotor. La solución debe moverse en pocillos – evite salpicaduras.

- BÜHLMANN utilice una lavadora de placa automatizada, programada en "modo supuesto de placa" es decir que cada paso de proceso (dispense) se realiza en todas las tiras secuencialmente, antes de procesar al paso siguiente (aspiración).
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- Debe hacerse todo lo posible para garantizar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos, muestras o entre pocillos.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.

## RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

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

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Diluya todas las muestras de pacientes a estudiar en proporción 1:1000 con tampón de incubación (p. ej. 2 µL de suero + 2000 µL de tampón de incubación). Mezcle bien mediante vórtex y deje las muestras diluidas durante una hora a entre 18 y 28 °C. Ponga tanto las muestras como los controles y calibradores reconstituidos durante 10 minutos en hielo antes de proceder al pipeteo en el paso nº 4.
  2. Prepare un soporte de placa con el número de tiras necesario para ensayar los calibradores, los controles y las muestras de pacientes. Vuelva a sellar inmediatamente las tiras restantes dentro de la bolsa metalizada junto con los paquetes de desecante. Consérvelas refrigeradas.
- Nota: Utilice reactivos fríos en los pasos nº 3 a 9.*
3. Lave los pocillos recubiertos cuatro veces utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado ¡frío! por pocillo. Vacíe los pocillos y golpee firmemente la placa

sobre papel secante para eliminar completamente el líquido restante.

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

## CONTROL DE CALIDAD

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

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

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

Todos los controles deben estar dentro de los intervalos de confianza establecidos. Los intervalos de confianza de los

controles son específicos del lote y aparecen impresos en la ficha de datos de CC que se suministra con este kit.

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

## ESTANDARIZACIÓN

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

## RESULTADOS Y CÁLCULOS

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

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

$$\text{Cociente} = \frac{\text{DO}_{450} \text{ neta media de la muestra}}{\text{DO}_{450} \text{ neta media del calibrador}}$$

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

## LIMITATIONS

1. Los resultados del ensayo deben interpretarse considerando la información disponible de estudios epidemiológicos, la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico
2. La prueba anti-SGPG Autoantibodies ELISA no ha sido validada para muestras de plasmaféresis.

## INTERVALOS DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE

### Cociente de corte propuesto

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

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

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

---

## CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

**Precisión Intra-Ensayo (Dentro de la Prueba): 4,9 %.** La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores de cuatro muestras de suero humano obtenidos en una única prueba (tabla 5).

**Precisión Inter-Ensayo (Prueba a Prueba): 10,0 %.** La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores de seis muestras de suero humano obtenidas en 20 pruebas distintas (tabla 6).

**Linealidad/ paralelismo de dilución: 154 %.** Se diluyeron con tampón de incubación (de 1:1.000 a 1:128.000) 13 muestras de suero humano que contenían titulaciones altas de anticuerpos anti-SGPG, se dejaron en reposo durante una hora a 18-28 °C y a continuación se analizaron según el procedimiento del ensayo. El cociente O/E (observado/esperado) se calculó paso a paso (tabla 7). Se ha sugerido que la desviación relativamente alta, particularmente a títulos de anticuerpo altos de las muestras, se debe a agregaciones de anticuerpos. En general, las muestras patológicas de suero muestran una titulación de auto-anticuerpos muy elevada, por lo que no afecta a la discriminación positiva/negativa.

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

**Límite de cuantificación (LoQ): cociente <0,15.** Se diluyó una muestra de suero positivo a auto-anticuerpos anti-SGPG (1:1.000-1:100.000). Se ensayaron 20 duplicados de cada dilución en una única prueba. Se calcularon la media, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (%CV) de los valores de absorbancia. Se obtuvo un cociente <0,145 con un CV inferior al 10 % (tabla 8).

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

1. Neutralización de auto-anticuerpos anti-SGPG: Se pudo inhibir progresivamente, según la concentración, la unión a las placas de microtitulación recubiertas con SGPG de dos muestras de suero con titulaciones altas de anti-SGPG al incubarlas durante 16 horas con tampón de incubación

a 4 °C con un suplemento creciente de SGPG (de 32 ng a 1.6 µg en Eq/galactosa) antes del ensayo del ELISA.

2. Especificidad de la unión de auto-anticuerpos anti-SGPG: Se analizaron 10 muestras de suero de titulación media y alta de auto-anticuerpos anti-gangliósido (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b y GQ1b) y 5 muestras de suero negativo con el ELISA autoanticuerpos anti-SGPG. Se observó un cociente inferior a 0.6 en 9 de 10 de las muestras de estas enfermedades y en todas las muestras de suero negativo. La muestra positiva se analizó también con una cromatografía de capa fina (TLC) para auto-anticuerpos anti-SGPG y anti-GD1a. La existencia de ambos tipos de anticuerpos se confirmó en la TLC.

# PORTUGUÊS

## USO PRETENDIDO

O BÜHLMANN anti-SGPG Autoantibodies ELISA é indicado para a determinação semiquantitativa para diagnóstico *in vitro* dos auto-anticorpos IgM humanos dirigidos contra o sulfato-3 glicuronil paraglobosídeo [SGPG] e o sulfato-3-glicuronil-lactosaminil paraglobosídeo [SGLPG]. O teste serve para auxiliar no diagnóstico da neuropatia desmielinizante paraproteinêmica (NDP), em conjunção com outros resultados clínicos e laboratoriais (1-6).

## PRINCÍPIO DO ENSAIO

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

A absorbância medida é proporcional ao título dos auto-anticorpos presentes em uma determinada amostra. Os títulos dos auto-anticorpos anti-SGPG humano são expressos como razões do calibrador e podem receber quatro categorias de títulos.

## REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Quantidade	Código	Reconstituição
<b>Placa de microtitulação</b> Pré-revestida com SGPG bovino	12 x 8-poços	B-SGPG-MP	Pronta para utilização
<b>Selador da placa</b>	3 unidades		
<b>Concentrado do tampão de lavagem (10x)</b> Com conservantes	1 frasco 100 mL	B-MAG-WB	Diluir com 900 mL de água deionizada.
<b>Tampão de incubação</b> Com conservantes	1 frasco 100 mL	B-MAG-IB	Pronto para utilização
<b>Calibrador<sup>1</sup></b> Soro humano com conservantes	1 frasco	B-SGPG-CA	Adicionar 1 mL de tampão de incubação
<b>Controles alto, médio e baixo<sup>2</sup></b> Soro humano com conservantes	3 frascos	B-SGPG-CONSET	Adicionar 1 mL de tampão de incubação

Reagentes	Quantidade	Código	Reconstituição
<b>Marcador enzimático IgM</b> Anti-IgM Ab humano conjugado a HRP em um tampão à base de proteína com conservantes.	1 frasco 11 mL	B-SGPG-ELM	Pronto para utilização Solução azul
<b>Substrato de TMB</b> TMB em tampão de citrato	1 frasco 11 mL	B-TMB	Pronto para utilização
<b>Solução de parada</b> Ácido sulfúrico 0,25 M	1 frasco 11 mL	B-STC	Pronta para utilização <b>Agente corrosivo</b>

Tabela 1

- O calibrador consiste em um soro positivo diluído que foi padronizado de acordo com uma referência estabelecida interna (consulte o capítulo sobre padronização e corte).
- Os controles baixo, médio e alto contêm quantidades de anticorpos anti-SGPG específicas ao lote. Consulte a folha de dados de CQ fornecida com o kit para obter as razões apropriadas.

## ARMAZENAMENTO E VIDA ÚTIL DOS REAGENTES

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

Tabela 2

## MATERIAIS NECESSÁRIOS, PORÉM NÃO FORNECIDOS

- Pipetas de precisão com ponteiros descartáveis capazes de pipetar os seguintes volumes: 2 µL, 100 µL e 1000 µL.
- Tubos descartáveis de poliestireno ou polipropileno para a preparação de diluições de amostras.
- Cilindro de 1000 mL para a diluição do tampão de lavagem.
- Pisseta para o tampão de lavagem ou lavador automático para a placa de microtitulação.
- Papel mata-borrão.
- Agitador orbital para placas de microtitulação.
- Leitora de placa de microtitulação para medição da absorbância a 450 nm.

## PRECAUÇÕES

### Precauções de segurança

- O calibrador (B-SGPG-CA) e os controles (B-SGPG-CONSET) deste kit contêm componentes de origem humana. Embora testados negativos para o antígeno de superfície do HBV, anticorpos HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manuseados como se fossem capazes de transmitir infecções, sempre de acordo com boas práticas laboratoriais e usando-se as precauções apropriadas.
- Solução de parada: A solução de parada (B-ST5) contém ácido sulfúrico (0.25 M). Esse composto é um irritante dos olhos, pele e membranas mucosas. Evite o contato com os olhos, a pele ou a roupa. Após o contato com os olhos ou a pele, lave imediatamente com água em abundância.
- Reagentes: Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente com quantidades abundantes de água, caso contrário, irritação/queimaduras poderão ocorrer.
- A solução não usada deve ser descartada de acordo com as regulamentações locais, estaduais ou federais.

### Precauções técnicas

- Leia atentamente as instruções antes de executar o teste. O desempenho dos testes será afetado negativamente se os reagentes forem diluídos incorretamente, modificados ou armazenados em condições diferentes daquelas detalhadas nesta instrução de uso.
- Os resíduos nos poços da placa de microtitulação resultam do processo de produção. Eles são removidos na etapa de lavagem (etapa 3 do procedimento do ensaio) e não afetam os resultados.
- Prepare os reagentes antes de iniciar o procedimento de teste. Os reagentes utilizados nas etapas 3-9 devem estar frios (2-8 °C) e devem ser mantidos frios durante a pipetagem e lavagem. Deixe que o substrato de TMB atinja a temperatura ambiente (18-28 °C).
- Etapas 3-9: Utilize reagentes frios (2-8 °C) em todas estas etapas e mantenha-os frios durante a pipetagem. Recomendação: Prepare o tampão de lavagem no fim do dia anterior à execução do ensaio e deixe-o no refrigerador a noite toda.
- Etapas de lavagem 3, 6 e 9: As etapas de lavagem são fundamentais para a remoção de resíduos dos poços da placa de microtitulação gerados pelo processo de produção (etapa 3), bem como de todos os auto-anticorpos não ligados (etapas 6 e 9).
  - As etapas de lavagem devem ser sempre realizadas com o tampão de lavagem frio (2-8 °C).
  - Certifique-se de que todos os poços estejam completamente vazios depois do último ciclo de lavagem.
- Etapa 10: Deixe que o substrato de TMB atinja a temperatura ambiente (18–28 °C) antes de usá-lo.
- Etapa 11: Agite as placas de microtitulação durante a incubação com o substrato. Dependendo do agitador de placas, recomendamos 400-600 rpm. A solução

deve se movimentar nos poços, mas sem transbordar nem derramar.

- Se uma lavadora automática for utilizada, o “modo de placa” deve ser selecionado para que a dispensação seja executada sequencialmente em todas as tiras antes da aspiração.
- Os componentes não devem ser usados depois da data de validade impressa nos rótulos.
- Não misture lotes diferentes de reagentes.
- Todas as providências devem ser tomadas para assegurar que não ocorra contaminação cruzada entre os reagentes, amostras ou entre poços.
- Os micropoços não podem ser reutilizados.

## COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

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

## PROCEDIMENTO DO ENSAIO

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

*Nota: use reagentes frios nas etapas 3 a 9.*

3. Lave os poços revestidos quatro vezes, usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio! por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão para remover completamente todo o líquido remanescente.



- 4a. Pipete 100 µL do tampão de incubação (branco) em duplicata nos poços A1+A2.
- 4b. Pipete 100 µL do calibrador em duplicata nos poços B1+B2.
- 4c. Pipete 100 µL do controle baixo em duplicata nos poços C1+C2.
- 4d. Pipete 100 µL do controle médio em duplicata nos poços D1+D2.
- 4e. Pipete 100 µL do controle alto em duplicata nos poços E1+E2.
- 4f. Pipete 100 µL de cada amostra diluída em duplicata nos poços subsequentes.
5. Cubra a placa com um selador e incube por 2 horas ( $\pm 5$  minutos) a 2-8 °C.
6. Remova o selador da placa. Esvazie os poços e lave quatro vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio (2-8 °C) por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão para remover o tampão de lavagem completamente.
7. Adicione 100 µL do marcador enzimático IgM a todos os poços.
8. Cubra a placa com um selador e incube por 2 horas ( $\pm 5$  minutos) a 2-8 °C.
9. Remova o selador da placa. Esvazie os poços e lave quatro vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem frio (2-8 °C) por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão para remover o tampão de lavagem completamente.

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

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

## RESULTADOS E CÁLCULO

**Calibrador:** Registre a absorbância a 450 nm ( $OD_{450}$ ) e subtraia o valor médio do branco. Calcule a média dos valores em duplicata. A razão do calibrador é calculada para um valor unitário (dividido por ele mesmo).

**Amostras e controles:** Registre a absorbância a 450 nm ( $OD_{450}$ ) para cada poço de amostra e de controle e subtraia o valor médio dos brancos. Calcule a média dos valores em duplicata. Calcule a razão entre a absorbância média das amostras e a absorbância média do calibrador.

$$\text{Razão} = \frac{OD_{450} \text{ líq. média da amostra}}{OD_{450} \text{ líq. média do calibrador}}$$

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

## CONTROLE DE QUALIDADE

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

A BÜHLMANN recomenda enfaticamente testar o branco, calibrador, os controles e as amostras em duplicata.

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

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

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

## PADRONIZAÇÃO

Os calibradores incluídos neste kit foram padronizados com base em um material de referência interno (soro diluído positivo). A diluição foi selecionada na faixa entre a OD para doadores de sangue normal e soros positivos.

## LIMITAÇÕES

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

## INTERVALOS DE REFERÊNCIA E VALORES DE CORTE

### Razão de corte proposta

A razão de fundo do anti-SGPG foi determinada usando-se 200 amostras de sangue de doadores assintomáticos voluntários (49 mulheres e 151 homens com idade entre 18 e 70 anos), testadas de acordo com o procedimento de teste. Somente 1/200 (0,5 %) das amostras apresentou uma razão  $> 1$ . Seis amostras de soro apresentaram razão entre 0,5 e 0,6, enquanto 193/200 (96,5 %) das amostras de soro apresentou valores abaixo de 0,5.

14 amostras de soro positivo para anti-MAG foram testadas. Cada uma delas apresentou uma razão de 2,4 ou maior. Os resultados podem ser vistos na tabela 4. Nós propomos uma razão de corte de 1.

Além disso, em um estudo externo incluindo 223 amostras de soro de pacientes afetados por uma neuropatia suspeita, o valor de corte proposto acima foi confirmado.

178 amostras de soro foram testadas usando-se o método de referência de cromatografia em camada delgada (CCD) descrito na literatura (4). 99/110 amostras de soro positivas por CCD foram também testadas positivas com o anti-SGPG Autoantibodies ELISA. 66/68 amostras de soro negativas por CCD também foram testadas negativas com o ELISA. Isso resulta em uma sensibilidade e uma especificidade calculadas do ELISA de 90,0 % e 97,1 %, respectivamente (comunicação pessoal do Dr. C. Caudie, Lyon, França).

GD1a, GD1b e GQ1b) e cinco de soro negativo foram testadas no anti-SGPG Autoantibodies ELISA. Nove desses dez soros de estado de doença e todos os soros negativos resultaram em uma razão menor que 0.6. A amostra testada positivamente foi analisada em mais detalhes por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) para os auto-anticorpos anti-SGPG e anti-GD1a. A existência de ambos os tipos de anticorpos foi confirmada pela CCD.

---

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

**Precisão intraensaio: 4.9 %.** A precisão intraensaio foi calculada a partir dos resultados de 20 pares de valores de quatro amostras de soro humano obtidos em uma única corrida (tabela 5).

**Precisão interensaio: 10.0 %.** A precisão intraensaio foi calculada a partir dos resultados de 20 pares de valores de seis amostras de soro humano obtidos em 20 corridas diferentes (tabela 6).

**Linearidade/ paralelismo da diluição: 154 %** 13 amostras de soro humano contendo títulos altos de anticorpos anti-SGPG foram diluídas com tampão de incubação entre 1:1000 e 1:128.000, deixadas em repouso por uma hora a 18-28 °C e então submetidas ao ensaio de acordo com o procedimento de teste. A razão O/E (observado/esperado) foi calculada passo a passo (tabela 7). Sugere-se que o desvio relativamente alto, em particular para títulos elevados de anticorpos nas amostras, se deva a agregações de anticorpos. De modo geral, soros patológicos mostram títulos bastante elevados de anticorpos e, portanto, não têm influência na discriminação positivo/negativo.

**Limite de branco (LoB): razão <0.01.** 20 duplicatas do tampão de incubação foram analisadas em uma única corrida. A média e o desvio padrão (DP) foram calculados para os valores de absorvância (OD). Uma vez subtraído o valor da absorvância do branco e calculada a razão, obteve-se um valor de 0.006.

**Limite de quantificação (LoQ): razão <0.15.** Um soro positivo para anticorpo anti-SGPG foi subsequentemente diluído (1:1000-1:100.000). 20 duplicatas de cada diluição foram analisadas em uma única corrida. A média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (% CV) foram calculados para os valores de absorvância. Uma razão de <0.145 foi encontrada com um CV menor de 10 % (tabela 8).

**Especificidade:** Dois conjuntos de experimentos foram realizados para avaliar a especificidade do anti-SGPG Autoantibodies ELISA:

1. Neutralização de auto-anticorpos anti-SGPG: Dois soros com títulos elevados de anti-SGPG puderam ser gradativamente mais inibidos para não se ligarem às placas de microtitulação revestidas com SGPG de modo dependente da concentração, quando pré-incubados por 16 horas com um tampão de incubação a 4 °C, suplementado por uma quantidade gradativamente crescente de SGPG (32 ng a 1.6 µg de SGPG em Eq/galactose) antes do teste no ELISA.

2. Especificidade da ligação dos auto-anticorpos anti-SGPG: Dez amostras de soro com títulos médio e alto de auto-anticorpos antigangliosídeos (GA1, GM1, GM2,

## APPENDIX I

### TABLES / TABELLEN / TABLES / TABELLE / TABLAS/ TABELAS

#### Examples of results

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

Table 3

#### Cut-off Ratio

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

Table 4

#### Intra-assay Precision

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

Table 5

#### Inter-assay Precision

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

Table 6

#### Dilution Linearity/Parallelism

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

Table 7

#### Functional Sensitivity

Sample Type	dilution	Ratio	SD	%CV
Serum 1	1:1	2.8	0.1	4.5
Serum 1	1:2	1.2	0	4.1
Serum 1	1:10	0.37	0.03	7.5
Serum 1	1:20	0.22	0.01	5.6
Serum 1	1:50	0.13	0.01	11.1
Serum 1	1:100	0.07	0.04	60.0
<b>%CV = 10 % at a Ratio of 0.145</b>				

Table 8

---

## APPENDIX II

### REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ REFERENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS/ REFERÊNCIAS

1. Ariga T, *et al.*: Characterization of sulphated glycuronic acid containing glycolipids reacting with IgM M-proteins in patients with Neuropathy. *J Biol Chem* 262(2),848-853 (1987).
2. Burger *et al.*: Anti-myelin-associated glycoprotein antibodies in patients with a monoclonal IgM gammopathy and polyneuropathy, and a simplified method for the preparation of glycolipid antigens. *J Immunol Meth* 140; 31-36 (1991).
3. Baumann N.: Specificity of antiglycolipid antibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 19;31-40 (2000)
4. Campant RM *et al.*: Détection des anticorps anti-myéline: mise au point et evaluation dans 75 cas de neuropathies associées à une IgM monoclonale. *Ann Biol Clin* 57;69-75 (1999)
5. Hadden R.D.M *et al.*, Paraproteinemic demyelinating neuropathies; *European Handbook of Neurological Management: Volume 1, 2nd Edition*, © 2011 Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-405-18533-2
6. Dalakas M C.; Advances in the diagnosis immunopathogenesis and therapies of IgM- anti-MAG antibody-mediated neuropathies; *Ther Adv Neurol Disord* 11, 1-12 (2018)

**anti-SGPG Autoantibody ELISA**

**Precoated Microtiter Plate**

↓ ↺ *wash 4 x*

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

↓ ↺ *incubate 2 hours (± 5 min) at 2-8 °C*  
*wash 4 x*

**add 100 µL Enzyme Label**

↓ ↺ *incubate 2 hours (± 5 min) at 2-8 °C*  
*wash 4 x*

**add 100 µL TMB Substrate**

↓ ↺ *incubate 30 minutes (± 2 min) at 18-28 °C*  
*on a plate rotator*

**add 100 µL Stop Solution**

**Read absorbance at 450 nm (within 30 minutes)**

→ **TIME TO RESULT: 4.5 HOURS**

---

**APPENDIX IV**

**NOTES / NOTIZEN / NOTES / NOTE / NOTAS**





---

**APPENDIX IV**

**NOTES / NOTIZEN / NOTES / NOTE / NOTAS**

APPENDIX V

SYMBOLS / SYMBOLE / SYMBOLES / SIMBOLI / SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad Data de expiração
<b>REF</b>	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo Número de catálogo
<b>LOT</b>	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote Código do lote
<b>IVD</b>	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Producto sánitario 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 Conteúdo suficiente para <n> testes
	Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso Leia cuidadosamente as instruções
	Temperature Limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura Límite de temperatura
<b>MP</b>	Microtiter Plate Mikrotiterplatte Microplaque Micropiastra Microplaca Placa de microtitulação
<b>SUBS TMB</b>	TMB Substrate TMB Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato TMB Substrato TMB

Symbol	Explanation
<b>BUF WASH 10X</b>	Wash Buffer Concentrate (10x) Waschpuffer Konzentrat (10x) Tampon de lavage concentré (10x) Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (10x) Concentrado do tampão de lavagem (10x)
<b>BUF INC</b>	Incubation Buffer Inkubationspuffer Tampon d'incubation Tampone di incubazione Tampón de incubación Tampão de incubação
<b>CAL</b>	Calibrator Kalibrator Calibrateur Calibratore Calibrador Calibrador
<b>CONTROL L</b>	Low Control Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo Controle Baixo
<b>CONTROL M</b>	Medium Control Kontrolle medium Contrôle medium Controllo medio Control medio Controle médio
<b>CONTROL H</b>	High Control Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto Controle alto
<b>EL IgM</b>	Enzyme Label IgM Enzymmarker IgM Marqueur enzymatique IgM Marcato enzimatico IgM Marcador enzimático de IgM Marcador enzimático IgM
<b>SOLN STOP</b>	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada Solução de parada

