



BÜHLMANN kappa/lambda Reagent Set

**Determination of
kappa and lambda light chains of IgM type
by EK-MAG**

B-KLSET 100 Tests

Revision date: 2015-11-05

ENGLISH

INTENDED USE

The kappa/lambda (κ/λ) Reagent Set is intended as accessory set for BÜHLMANN anti-MAG ELISA, EK-MAG, in order to determine anti-MAG kappa and lambda light chains of IgM type in human serum.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Enzyme Label IgM kappa	1 vial 12 ml	B-MAG-ELMK	Ready to use
Enzyme Label IgM lambda	1 vial 12 ml	B-MAG-ELML	Ready to use

Table 1

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Sealed/ Unopened Reagents
Store at 2-8°C. Do not use past expiration date.
Opened reagents
Stable at 2-8°C until expiration date.

Table 2

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- Serum samples may be potentially infectious and should be handled according to Good Laboratory Practice (GLP) using appropriate precautions.
- Clinical specimens may contain infectious agents e.g. Hepatitis B virus and HIV.
- Wear appropriate personal protective equipment to avoid contact with eyes and skin.
- Unused solution should be disposed of according to local State and Federal regulations.

TECHNICAL PRECAUTIONS

- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Test performance will be adversely affected if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in Table 2.
- Avoid contamination of reagents.
- Every effort should be made to ensure that no cross contamination occurs between wells. It is essential that enzyme-conjugated monoclonal antibody is not allowed to contaminate reagents and equipment. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well. Conjugate allowed to dry on to the rim of the well may adversely affect the performance of the test.
- All equipment including washers and liquid handling devices must be free of microbial contamination and be correctly calibrated and maintained according to the manufacturer's instructions.
- Microwells cannot be re-used.
- Protect substrate from light.
- It is recommended that samples are run in duplicate until the laboratory is totally familiar with the assay.

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

REAGENTS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Reagents	Supplier	Code	Processing
Anti-MAG ELISA Kit	BÜHLMANN Laboratories AG	EK-MAG	Refer to instruction for use

Table 3

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- The procedure calls for <0.1 ml of blood or <50 μ l of serum.
- Lipemic, hemolytic and icteric samples should not be used in this assay. Lipemic samples can be avoided by asking patients to fast for at least 12 hours prior to the sample being taken.
- Collect blood into plain tubes, avoid hemolysis, leave to clot for one hour at RT (18-28°C), centrifuge for 15 minutes at approximately 1800 x g at RT and collect the serum.
- Store serum samples at \leq -20°C. Samples are stable for \geq 1 year if stored at \leq -20°C.
- Avoid repeated freeze-thaw cycles. Frozen samples should be thawed and mixed thoroughly by gentle swirling or inversion prior to use.

ASSAY PROCEDURE

1. Dilute all patient samples 1:1000 with cold Incubation Buffer (B-MAG-IB) (e.g. 2 μ l of serum + 2 ml of Incubation Buffer). Allow diluted samples to set for one hour at 18-28°C vortex from time to time. Put samples for 10 minutes on ice prior to pipetting in step 4.
2. Prepare sufficient strips (wells) of a MAG microtiter plate (B-MAG-MP) in order to test the desired number of samples and controls. Reseal excess strips in the foil pouch together with the desiccant packs **without delay**. Store them refrigerated.

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

3. Wash the coated wells four times using at least 300 μ l of refrigerated Wash Buffer (B-MAG-WB) per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.

- 4a. Pipet 100 µl of the High Control (B-MAG-CONSET) in quadruplicate into wells A1+A2 and B1 + B2.
 - 4b. Pipet 100 µl of each diluted sample in quadruplicate into the subsequent wells.
 5. Cover the plate with a Plate Sealer and incubate for 2 hours (± 5 min) at 2-8°C.
 6. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and wash four times using at least 300 µl of **refrigerated** Wash Buffer per well. Empty the wells and strike plate firmly onto blotting paper.
 - 7a. Add 100 µl of Enzyme Label IgM kappa to the first row (A1, B1, C1 ...) of wells for each sample/control and
 - 7b. add 100 µl of Enzyme Label IgM lambda to the second row of wells (A2, B2, C2 ...) for each sample/control
 8. Cover the plate with plate sealer and incubate for 2 hours (± 5 min) at 2-8°C.
 9. Remove and discard plate sealer. Empty the wells and wash four times using at least 300 µl of **refrigerated** Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
- Note: Allow TMB substrate solution to reach 18-28°C.**
10. Add 100 µl of TMB Substrate Solution (B-MAG-TMB) to each well.
 11. Cover plate with a Plate Sealer, place it on a plate mixer set at 800-1000 rpm, protect plate from direct light and incubate for 30 minutes (± 5 min) at 18-28°C.
 12. Add 100 µl of Stop Solution (B-MAG-STS) to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 13. within 30 minutes.
 13. Read absorbance at 450 nm in a Microtiter Plate reader.

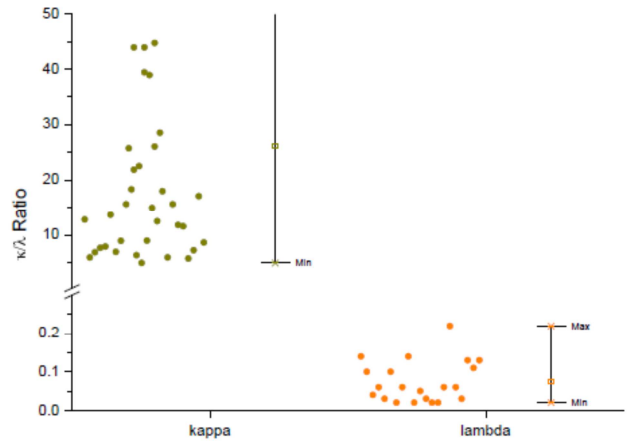


Figure 1: Quitard A et al; 2011. Determination of subtypes IgM kappa and IgM lambda in patients with an anti-MAG antibody neuropathy; (2011).

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this package insert is necessary for the successful use of the product. Refer also the information given in the package insert of the anti-MAG ELISA (order code EK-MAG).

Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this package insert.

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

All controls must fall within established confidence limits.

The isotype of the control sample is printed on the additional data sheet.

PERFORMANCE LIMITATIONS

HAEMOLYSIS

Grossly haemolysed samples should not be used as lower assay values may be obtained.

LIPEMIC Serum

Samples should be taken from fasting individuals.

RESULTS

Calculation and Cut-off

- Record the absorbance at 450 nm of each diluted patient sample.
- Average duplicate values.
- For calculation compare OD[kappa] with OD[lambda]

$$Ratio = \frac{OD[kappa]}{OD[lambda]}$$

The cut-off for monoclonality is set as follows (see Figure 1):

- kappa –light chain: Ratio > 4
- lambda –light chain: Ratio < 0.25

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Die kappa/lambda (κ/λ) Reagenziensatz ist als Zubehör-Set für BÜHLMANN anti-MAG ELISA bestimmt, EK-MAG, um die anti-MAG kappa und lambda leichten Ketten von IgM-Typ im menschlichen Serum zu bestimmen.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Enzym Label IgM kappa	1 vial 12 ml	B-MAG-ELMK	Gebrauchsfertig
Enzym Label IgM lambda	1 vial 12 ml	B-MAG-ELML	Gebrauchsfertig

Tabelle 4

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien
Zu verwenden bis zum Verfallsdatum angegeben auf der Packungsetikette. Lagerung bei 2-8°C.
Geöffnete Reagenzien
Zu verwenden bis zum Verfallsdatum. Bei 2-8°C lagern.

Tabelle 5

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Serum Probe enthalten Komponenten humaner Herkunft. Alle Proben sollten gemäss Gute Herstellungspraxis (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- Klinische Proben können infektiöses Material enthalten z.B. Hepatitis B Virus und HIV.
- Geeignete persönliche Schutzausrüstung tragen, um Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
- Nicht verwendete Lösungen sind entsprechend den lokalen staatlichen und bundesstaatlichen Vorschriften zu entsorgen.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- Komponenten nicht nach Ablaufdatum verwenden.
- Mische nicht verschiedene Reagenzien Lots
- 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.
- Kontamination der Reagenzien vermeiden.
- Es sollte alles getan werden, um sicherzustellen, dass keine Kreuzkontamination zwischen den Vertiefungen auftritt. Wesentlich ist, mit Enzym-konjugiertem monoklonalen Antikörper nicht Reagenzien und Ausrüstung zu verunreinigen. Es sollte darauf geachtet werden, die Kavitäten nicht zu berühren und Spritzer vermeiden. Konjugate trocknen lassen. Nicht getrocknete Konjugate kann negative Auswirkungen auf die Leistungsfähigkeit des Tests haben.
- Vermeiden Sie, dass es zu einer Kontamination zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und zwischen den Wells kommt. Geräte müssen korrekt

kalibriert sein und ordnungsgemäss gewartet werden.

- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Substrate vor Licht schützen.
- Es wird empfohlen, die Proben in Duplikaten zu messen, bis das Labor mit dem Assay vertraut ist.
- Testergebnisse sollten in Verbindung mit Informationen aus epidemiologischen Studien, klinische Beurteilung des Patienten und anderen diagnostischen Verfahren interpretiert werden.

ERFORDERLICHE REAGENZIEN

Reagenz	Lieferant	Art.-Nr.	Rekonstitution
Anti-MAG ELISA Kit	BÜHLMANN Laboratories AG	EK-MAG	Siehe entsprechende Bedienungsanleitung

Tabelle 6

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

- Dieser Test benötigt <0.1 ml Blut oder <50 µl Serum.
- Hämolytische lipämische oder ikterische Proben können nicht verwendet werden. Lipämische Proben können verhindert werden, indem man die Patienten bittet für mindestens 12 Stunden vor der Probenentnahme nüchtern zu bleiben.
- Blutproben in den entsprechenden Röhrchen sammeln (ohne Antikoagulantien). Hämolyse vermeiden. Eine Stunde lang bei RT (18-28°C) gerinnen lassen. 10 Minuten lang bei RT und ca. 1500 x g zentrifugieren, danach das Serum abgiessen.
- Proben lagern bei ≤-20°C. Bei ≤-20°C gelagert, sind die Proben für 1 Jahr stabil.
- Für die Probenlagerung empfehlen wir die Herstellung von Aliquots um wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden. Die Proben sollten vor dem Gebrauch aufgetaut und durch gründliches Vortexen gut gemischt werden.

ARBEITSANLEITUNG

1. Patientenproben mit kaltem Inkubationspuffer (B-MAG-IB) 1:1000 verdünnen (z.B. 2 µl Serum + 2 ml Inkubationspuffer), mit dem Vortexer gut mischen und anschliessend die verdünnten Proben 60 Minuten lang bei 18-28° C äquilibrieren lassen. Proben für 10 Minuten auf Eis bevor man pipettiert in Schritt 4.
2. Eine Mikrotiterplatte (B-MAG-MP) mit ausreichend Streifen für das Testen der gewünschten Proben bestücken. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und sofort mit dem Trockenmittel verpacken und gekühlt lagern.

Wichtig: In den Schritten 3 bis 10 gekühlte (2-8°C) Lösungen benutzen.

3. Die Platte zweimal mit jeweils 300 µl kaltem Waschpuffer (B-MAG-WB) waschen. Waschpuffer dekantieren und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen.
 - 4a. 100 µl von der hohen Kontrolle (B-MAG-CONSET) in vierfacher Ausführung in Kavitäten A1+A2 und B1 + B2 pipettieren.
 - 4b. 100 µl von jeder verdünnter Probe in vierfacher Ausführung in die nachfolgenden Kavitäten pipettieren.
 5. Mikrotiterplatte mit einer Abdeckfolie abdecken und für 2 Stunden (± 5 min) bei 2-8°C inkubieren.
 6. Abdeckfolie entfernen, die Mikroküvetten entleeren und viermal mit jeweils 300 µl kaltem Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen
 - 7a. 100 µl vom Enzym Label IgM kappa in die erste Reihe (A1, B1, C1 ...) der Wells für jede Probe/Kontrolle und
 - 7b. 100 µl vom Enzym Label IgM kappa in die zweite Reihe der Wells (A2, B2, C2 ...) für jede Probe/Kontrolle zufügen.
 8. Mikrotiterplatte mit einer Abdeckfolie abdecken und für 2 Stunden (± 5 min) bei 2-8°C inkubieren.
 9. Abdeckfolie entfernen, die Mikroküvetten entleeren und dreimal mit jeweils 300 µl kaltem Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen.
- Wichtig: TMB-Substratlösung auf 18-28°C äquilibrieren.**
10. 100 µl TMB-Substratlösung (B-MAG-TMB) zu jeder Mikroküvette zugeben.
 11. Mikrotiterplatte mit einer Abdeckfolie abdecken, auf ein Mikrotiterplattenschüttler bei 800-1000 rpm platzieren. Platte vor direktem Licht schützen und für 30 Minuten (± 5 min) bei 18-28°C inkubieren.
 12. 100 µl Stop-Lösung (B-MAG-STTS) in jeder Kavität zugeben. Luftblässchen mit Pipettenspitzen entfernen. Weitermachen mit Schritt 13. innerhalb 30 Minuten.
 13. Messen der optische Dichte bei 450 nm

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Auwertung und Cut-offs

- Optische Dichte aller Mikroküvetten (Kalibrator, Kontrollen und Patientenproben) bei 450 nm messen.
- Middle die duplikaten Werte
- Für die Berechnung vergleiche OD[kappa] mit OD[lambda]

$$Ratio = \frac{OD[kappa]}{OD[lambda]}$$

Der cut-off für Monoklonalität ist folgendermassen gesetzt (siehe Bild 1):

- kappa –light chain: Ratio > 4
- lambda –light chain: Ratio < 0.25

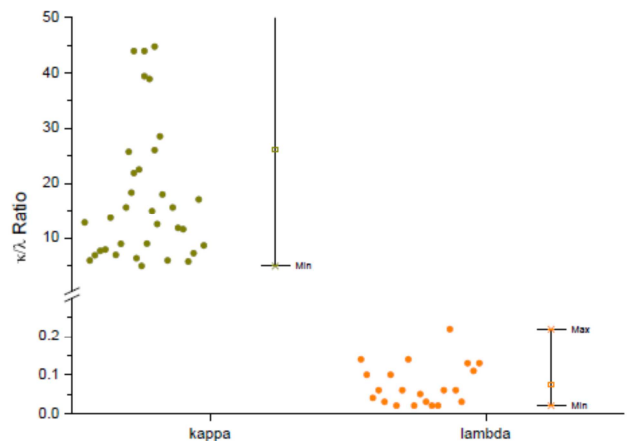


Bild 1: Quitard A et al; 2011. Determination of subtypes IgM kappa and IgM lambda in patients with an anti-MAG antibody neuropathy; 2011).

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Packungsbeilage ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Lesen Sie auch die Informationen in der Packungsbeilage des Anti-MAG ELISA (Bestellcode EK-MAG) vergeben. Zuverlässige Resultate werden nur durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung erreicht.

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

Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich (% Ratio) liegen. Der Isotyp der Kontrollprobe wird auf dem Zusatzdatenblatt gedruckt.

EINSCHRÄNKUNGEN DER LEISTUNGSMERKMALE

HAEMOLYSE

Grob hämolysierten Proben sollten nicht verwendet werden, da niedrigere Testwerte erhalten werden können.

LIPEMISCHES SERUM

Die Proben sollten von den Individuen die gefastet haben, entnommen werden.

FRANCAIS

DOMAINE D'UTILISATION

Le coffret kappa / lambda (κ/λ) est conçu comme jeu d'accessoires pour BÜHLMANN anti-MAG ELISA, EK-MAG, afin de déterminer anti-MAG kappa et lambda chaînes légères de type IgM dans le sérum humain.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Marqueur enzymatique IgM kappa	1 flacon 12 ml	B-MAG-ELMK	Prêt à l'emploi
Marqueur enzymatique IgM lambda	1 flacon 12 ml	B-MAG-ELML	Prêt à l'emploi

Table 7

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts / non entamés
Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.
Réactifs ouverts
Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.

Table 8

PRECAUTIONS

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Les échantillons de sérum peuvent être potentiellement infectieux et doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL) en utilisant les précautions appropriées.
- Les échantillons cliniques peuvent contenir des agents infectieux, par exemple Virus de l'hépatite B et le VIH.
- Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
- Pour en savoir plus sur les précautions pour la manipulation et l'élimination des réactifs du kit, nous vous recommandons fortement de consulter l'organisme réglementaire compétent pour votre pays.

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

- Les 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.
- 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.
- Éviter la contamination des réactifs.
- Il convient de prendre toutes les précautions requises pour empêcher toute contamination croisée entre puits. Il est essentiel que l'anticorps monoclonal conjugué à une enzyme ne peut pas contaminer les réactifs et le matériel. Des précautions doivent être prises pour éviter de toucher ou éclabousser le bord du puits. Conjugué laisse sécher sur la jante du puits peut nuire à la performance de l'essai.
- Tous les équipements, y compris les rondelles et les dispositifs de manipulation de liquides doit être libre de toute contamination microbienne et être correctement calibré et entretenu conformément aux instructions du fabricant.

- Les micropuits sont à usage unique.
- Protéger la solution de substrat de la lumière directe.
- Il est recommandé que les échantillons soient analysés en double jusqu'à ce que le laboratoire soit totalement familier avec le dosage.
- Les résultats des tests doivent être interprétés en conjonction avec les informations disponibles à partir d'études épidémiologiques, l'évaluation clinique du patient, et d'autres procédures de diagnostic.

REACTIFS REQUIS MAIS NON FOURNI

Reagents	Fournisseur	Code	Reconstitution
Coffre Anti-MAG ELISA	BÜHLMANN Laboratories AG	EK-MAG	Faire référence à Mode d'emploi

Table 9

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision de 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 de la dilution du tampon de lavage.
- Laveur automatique de microplaques ou pissette pour le tampon de lavage.
- Agitateur de microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

- La procédure requiert <0.1 ml de sang ou <50 µl de sérum.
- Ne pas utiliser d'échantillons hémolytiques ou ictériques. Les échantillons lipémiques peuvent être évités en demandant aux patients de jeûner pendant au moins 12 heures avant de l'échantillon étant prise.
- Prélever le sang dans des tubes prévus à cet usage en évitant l'hémolyse, laisser coaguler à température ambiante (18-28°C) pendant 1 heure, centrifuger à environ 1800 x g à température ambiante pendant 15 minutes à température ambiante et recueillir le sérum.
- Conserver les échantillons de sérum à ≤-20°C. Échantillons dont la stabilité est ≥1 année, si conservé à ≤-20 ° C.
- Éviter les cycles répétés de congélation/décongélation. Les échantillons congelés doivent être décongelés et homogénéisés par agitation ou par inversion avant leur utilisation.

PROCEDURE

- Effectuer une dilution au 1:50 des échantillons de patient avec le tampon d'incubation (B-MAG-IB) froid (ex. 2 µl de sérum + 2 ml de tampon d'incubation). Laisser reposer les échantillons dilués 1 heure à 18-28°C et mélanger avec soin (vortex) de temps en temps. Mettre les échantillons pendant 10 minutes sur la glace avant le pipetage à l'étape 4.
- Préparer une micro-plaque (B-MAG-MP) avec suffisamment de barrettes pour tester le nombre désiré d'échantillons et controls. Retirer les barrettes en trop du support et les remettre immédiatement au froid dans le sachet prévu à cet effet et contenant le dessiccateur.

Important: N'utiliser que des réactifs réfrigérés (2-8°C) pour les étapes 3 à 9.

3. Laver chaque puits de la microplaque 4 fois avec 300 µl de tampon de lavage (B-MAG-WB). Vider les puits et taper la microplaque sur du papier absorbant afin d'éliminer complètement le tampon de lavage.
- 4a. Distribuer 100 µl de Control haute (B-MAG-CONSET) en quadruple dans les puits A1+A2 et B1 + B2.
- 4b. Distribuer 100 µl de sérum dilué du patient en quadruple dans les puits suivants.
5. Couvrir la plaque à l'aide du film adhésif fourni et incubé à 2-8°C pendant 2 heures ± 5 minutes.
6. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver 4 fois chaque puits avec 300 µl de tampon de lavage **réfrigéré**. Vider les puits et les sécher en tapant la microplaque sur du papier absorbant.
- 7a. Ajouter 100 µl de marqueur enzymatique IgM kappa à la première rangée (A1, B1, C1 ...) de puits pour chaque échantillon / contrôle et
- 7b. ajouter 100 µl marqueur enzymatique IgM lambda à la deuxième rangée de puits (A2, B2, C2 ...) pour chaque échantillon / contrôle
8. Couvrir la plaque à l'aide du film adhésif fourni et incubé à 2-8°C pendant 2 heures ± 5 minutes.
9. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver 4 fois chaque puits avec 300 µl de tampon de lavage **réfrigéré**. Vider les puits et les sécher en tapant la microplaque sur du papier absorbant.

Important: Laisser la solution de substrat atteindre une température de 18-28°C.

10. Ajouter 100 µl de solution de substrat (B-MAG-TMB) dans chaque puits.
11. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif puis l'incuber sur un agitateur de microplaque à 800-1000 rpm à 18-28°C durant 30 ± 5 minutes. Protéger la micro-plaque de la lumière directe.
12. Ajouter 100 µl de solution stop (B-MAG-STS) dans chaque puits. Passer à l'étape 13 dans les 30 minutes suivantes.
13. Mesure de l'absorbance (OD) de micro-plaque à 450 nm.

RESULTATS

Calculations du Cut-off

- Enregistrer l'absorbance à 450 nm de chaque échantillon de patient dilué.
- Les valeurs en double moyenne.
- Pour le calcul comparer OD [kappa] avec OD [lambda]

$$Ratio = \frac{OD[kappa]}{OD[lambda]}$$

La coupure pour monoclonalité est fixé comme suit (voir la figure 1):

chaîne de kappa: Ratio > 4
 chaîne de lambda: Ratio < 0,25

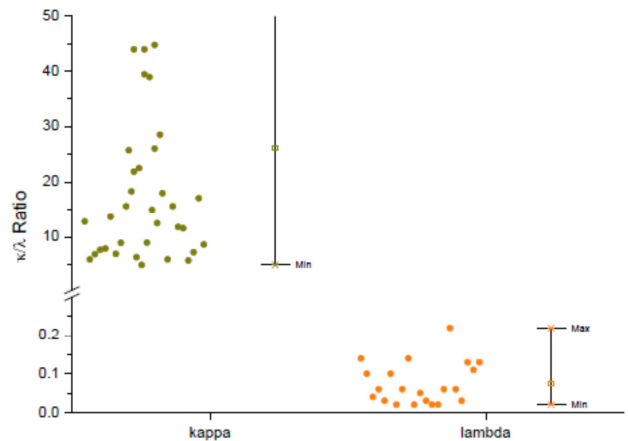


Figure 1: Quitard A et al; 2011. Determination of subtypes IgM kappa and IgM lambda in patients with an anti-MAG antibody neuropathy; 2011).

CONTROL QUALITE

Une compréhension approfondie de cette notice est nécessaire pour la bonne utilisation du produit. Reportez-vous aussi l'information donnée dans la notice de l'anti-MAG ELISA (code de commande EK-MAG). Résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire en cours) et suivant exactement cette notice. Comme il n'existe pas de sérum de référence pour les anticorps anti-MAG commercialement disponible, nous recommandons l'utilisation d'un pool de sérums positifs comme référence de contrôle de qualité interne. Tous les contrôles doivent avoir une valeur comprise entre les limites de confiance établies. L'isotype de l'échantillon de contrôle est imprimé sur la feuille de données supplémentaires.

LIMITATIONS

HÉMOLYSE

Grossièrement échantillons hémolysés ne doivent pas être utilisés comme valeurs de dosage inférieurs peuvent être obtenus.

SERUM LIPÉMIQUES

Les échantillons doivent être prélevés sur des sujets à jeun.

ITALIANO

USO PREVISTO

Il Set di reagenti kappa / lambda (κ/λ) è inteso come set di accessori per il test BÜHLMANN anti-MAG ELISA, EK-MAG, per la determinazione anti-MAG kappa e lambda catene leggere di tipo IgM nel siero umano.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Marcato enzimatico IgM kappa	1 flacone 12 ml	B-MAG-ELMK	Pronto all'uso
Marcato enzimatico IgM lambda	1 flacone 12 ml	B-MAG-ELML	Pronto all'uso

Table 10

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti sigillati
Conservare a 2-8° fino alla data di scadenza indicata sulle etichette.
Reagenti Aperti
Conservare a 2-8° fino alla data di scadenza indicata sulle etichette.

Table 11

PRECAUZIONI

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- I campioni di siero possono essere potenzialmente infetti e devono essere trattati secondo le buone pratiche di laboratorio (BPL) con le opportune precauzioni.
- I campioni clinici possono contenere agenti infettivi ad esempio Virus dell'epatite B e l'HIV.
- Indossare dispositivi di protezione adeguati per evitare il contatto con gli occhi e la pelle.
- 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

- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- 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.
- Evitare la contaminazione di reagenti
- Fare ogni tentativo per assicurarsi che tra i pozzetti non vi siano contaminazioni incrociate. È essenziale che l'anticorpo monoclonale coniugato enzimatico non contamina reagenti e attrezzature. Si deve prestare attenzione per evitare di toccare il bordo del pozzetto. Lasciare asciugare il coniugato al bordo del pozzetto. Se non si asciuga bene può influire negativamente sulle prestazioni del test.
- Tutte le apparecchiature comprese, i dispositivi automatici per lavaggio e dispositivi di manipolazione dei liquidi devono essere privi di contaminazione microbiologica ed essere tarati correttamente e secondo le istruzioni del produttore.
- I micropozzetti non possono essere riutilizzati.
- Proteggere il substrato dalla luce.

- Si raccomanda che i campioni siano eseguiti in duplicato fino a quando il laboratorio è totalmente familiare con il test.
- I risultati dei test devono essere interpretati in combinazione con le informazioni disponibili da studi epidemiologici, la valutazione clinica del paziente e ad altre procedure diagnostiche.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Reagenti	Fornitore	Codice	Elaborazione
Test Anti-MAG ELISA	BÜHLMANN Laboratories AG	EK-MAG	Fare riferimento a istruzioni per l'uso

Table 12

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso: 2 µl, 100 µl e 1000 µl.
- Provette di polistirene o polipropilene monouso per la preparazione di diluizioni del campione.
- Cilindro da 1000 ml per la diluizione del tampone di lavaggio concentrato.
- Lavatore per micropiastra o flacone per il Tampone di Lavaggio
- Agitatore per micropiastra.
- Lettore per micropiastra per le misurazioni dell'assorbanza a 450 nm.

PRELIEVO DEI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

- La procedura richiede <0.1 ml di sangue e <50 µl di siero, rispettivamente.
- Non utilizzare campioni grossolanamente emolizzati, lipemici o itterici. I campioni lipemici possono essere evitati chiedendo ai pazienti di digiunare per almeno 12 ore prima della presa del campione.
- Prelevare il sangue in provette semplici (senza anticoagulanti), evitare l'emolisi, lasciare che coaguli per un'ora a temperatura ambiente (18-28 ° C), centrifugare per 15 minuti a circa 1800 x g, a temperatura ambiente, e prelevare il siero.
- Conservare il siero ad ≤ -20°C. I campioni tenuti a ≤ -20°C sono stabili fino ad ≥1 anno.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento / scongelamento. I campioni congelati devono essere scongelati completamente, quindi vortexati prima dell'utilizzo.

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

1. Diluire tutti i campioni 1:1000 con il tampone di incubazione (B-MAG-IB) freddo (ad es.: 20 µl di siero + 2 ml di tampone di incubazione). Mescolare di volta in volta e lasciare i campioni per l'equilibratura 60 minuti a 18-28°C. Mettere i campioni per 10 minuti in ghiaccio prima di dispensare al punto 4.
2. Preparare una MAG piastra (B-MAG-MP) con strip a sufficienza per effettuare il test del numero desiderato di campioni e controlli. Eliminare le strip in eccedenza dal supporto e risigillarle immediatamente nella busta insieme all'essiccante. Conservare refrigerato

Importante: Utilizzare reagenti refrigerati (2-8°C) nel punto 3. al punto 9.

3. Lavare quattro volte i pozzetti coattati utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio (B-MAG-WB) refrigerati per pozzetto. Svuotare i pozzetti e blottare la piastra su carta assorbente assicurandosi che i pozzetti siano completamente vuoti.

- 4a. Dispensare 100 µl del controllo alto (B-MAG-CONSET) in quadruplicato nei pozzetti A1 + A2 e B1 + B2
- 4b. Dispensare 100 µl del siero diluito in quadruplicato nei pozzetti successivi.
5. Coprire la piastra con un foglio protettivo e incubare per 2 ore (± 5 minuti) a 2-8°C.
6. Togliere ed eliminare il foglio protettivo. Svotare i pozzetti e lavarli quattro volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio **refrigerato** per pozzetto. Svotare i pozzetti e blotarli su carta assorbente assicurandosi che i pozzetti siano completamente vuoti.
- 7a. Aggiungere 100 µl di marcato enzimatico IgM kappa a i pozzetti della prima riga (A1, B1, C1 ...) e
- 7b. aggiungere 100 µl di marcato enzimatico IgM lambda a i pozzetti della seconda riga (A2, B2, C2 ...) per ogni siero / controlli
8. Coprire la piastra con il foglio protettivo ed incubare per 2 ore (± 5 minuti) a 2-8°C.
9. Togliere ed eliminare il foglio protettivo. Svotare i pozzetti e lavarli tre volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio **refrigerato** per pozzetto. Svotare i pozzetti e blotarli su carta assorbente.

Importante: Lasciare che il Substrato di TMB raggiunga 18-28°C.

10. Aggiungere 100 µl del substrato di TMB (B-MAG-TMB) ad ogni pozzetto.
11. Sigillare la piastra con un foglio protettivo, collocare la piastra su un mixer settato a 800-1000 rpm, proteggere la piastra dalla luce diretta ed incubare per 30 (± 5 minuti) a 18-28°C.
12. Aggiungere 100 µl di soluzione bloccante (B-MAG-STs) ai pozzetti. Rimuovere le bolle d'aria con una pipetta. Procedere al punto 13. entro 30 minuti.
13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastra

RESULTATI E CALCOLO

Calcolazione del Cut-off

- Annotare l'assorbanza (OD) a 450 nm per ciascun pozzetto con del siero diluito del paziente.
- Calcola i valori medi dei duplicati
- Per il calcolo confrontare OD [kappa] con OD [lambda]

$$Ratio = \frac{OD[kappa]}{OD[lambda]}$$

Il cut-off per monoclonalità è impostato come seguente (vedi Figure 1):

- | | |
|--------------------------|--------------|
| kappa –catena leggera: | Ratio > 4 |
| lambda – catena leggera: | Ratio < 0.25 |

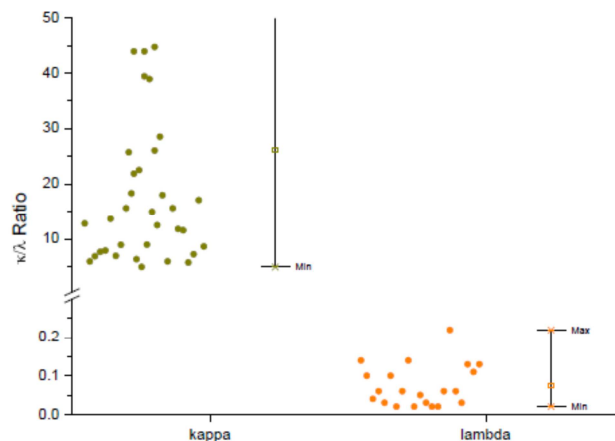


Figure 1: Quitard A et al; 2011. Determination of subtypes IgM kappa and IgM lambda in patients with an anti-MAG antibody neuropathy; 2011.

CONTROLLO DI QUALITA'

La piena comprensione di questa metodica è necessaria per un uso ottimale del prodotto. Consultare anche le informazioni contenute nel foglietto illustrativo del test anti-MAG ELISA (codice EK-MAG).

Risultati affidabili potranno essere ottenuti solo utilizzando tecniche di laboratorio precise (odierna linee guida GLP) e seguendo accuratamente le istruzioni contenute in questa metodica.

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

Tutti i controlli devono cadere entro i limiti di confidenza stabiliti. I limiti di confidenza per i controlli sono stampati sul foglio di lavoro addizionale.

LIMITI DELLE PRESTAZIONI

EMOLISI

Grossolanamente campioni emolizzati non devono essere utilizzati come si possono ottenere valori di analisi più bassi.

SIERO LIPEMICO

I campioni devono essere prelevati da individui a digiuno.

USO PREVISTO

El kappa / lambda (κ/λ) reactivo conjunto pretende ser juego de accesorios para BÜHLMANN anti-MAG ELISA, EK-MAG, con el fin de determinar kappa y lambda anti-MAG y ligeras cadenas de tipo IgM en suero humano.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Marcador de enzima IgM kappa	1 vial 12 ml	B-MAG-ELMK	Listo para usar
Marcador de enzima IgM lambda	1 vial 12 ml	B-MAG-ELML	Listo para usar

Table 13

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir
Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas
Reactivos abiertos
Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas

Table 14

PRECAUCIONES

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Las muestras de suero pueden ser potencialmente infecciosos y deben ser manejados de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), utilizando las precauciones adecuadas.
- Muestras clínicas pueden contener agentes infecciosos, por ejemplo, Virus de la hepatitis B y el VIH.
- Use el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel.
- Las soluciones/reactivos no utilizados deben eliminarse según la normativa local.

PRECAUCIONES TÉCNICAS

- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- 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.
- Evite la contaminación de los reactivos
- Debe hacerse todo lo posible para garantizar que no se produzca contaminación cruzada entre pocillos. Es esencial que el anticuerpo monoclonal conjugado con enzima no está permitido para contaminar los reactivos y equipos. Se debe tener cuidado de evitar tocar o salpicar el borde del pozo. Conjugado se deja secar en el borde del pocillo. Conjugado no seca puede afectar negativamente al rendimiento de el ensayo.
- Todo el equipo incluidas las lavadora de placa y dispositivos de manejo de líquidos debe estar libre de contaminación microbiológica y ser calibrado y mantenido correctamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.

- Proteja sustrato de la luz.
- Se recomienda que las muestras se realizaron por duplicado hasta que el laboratorio está totalmente familiarizado con el ensayo.
- Resultados de la prueba deben ser interpretados en conjunto con la información disponible a partir de estudios epidemiológicos, la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.

REACTIVOS NECESARIOS NO INCLUIDOS

Reactivos	Proveedor	Código	Tratamiento
Ensayo Anti-MAG ELISA	BÜHLMANN Laboratories AG	EK-MAG	Referirse a instrucciones de uso

Table 15

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables: pipetas de 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 reconstitución del tampón de lavado.
- Botella flexible para el tampón de lavado o dispositivo automático de lavado.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- El procedimiento requiere <0,1 ml de sangre y <50 µl de suero.
- No utilice muestras excesivamente hemolizadas o lipémicas ni muestras ictericas. Las muestras lipémicas se pueden evitar pedir a los pacientes a ayunar durante al menos 12 horas antes de la muestra que se toma.
- Recoja la sangre en tubos limpios, evite la hemólisis, deje coagular durante una hora a temperatura ambiente (18-28 ° C), centrifugue durante 15 minutos a unos 1800 x g a temperatura ambiente y recoja el suero
- Las muestras de suero tienda en ≤-20 °C. Las muestras son estables durante ≥1 años si se almacena a ≤-20 ° C.
- Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente con un agitador vortex antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- Diluya todas las muestras del paciente 1:1000 con el tampón de incubación (B-MAG-IB) frío (p.ej. 2 µl de suero + 2 ml de tampón de incubación). Dejar que las muestras diluidas para ajustar durante una hora a 18-28°C, vórtice de vez en cuando. Poner las muestras durante 10 minutos en hielo antes de pipetear en el paso 4.
- Prepare una placa MAG (B-MAG-MP) con tiras suficientes para probar el número deseado de muestras de pacientes y controles. Retire las tiras sobrantes del soporte y guárdelas en la bolsa metalizada junto con los sacos desecantes sin demora. Almacénelo refrigerado.

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

3. Lave dos veces los pocillos recubiertos utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado (B-MAG-WB) refrigerado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante para eliminar tampón de lavado completamente.
 - 4a. Pipetear 100 µl de control alto (B-MAG-CONSET) por cuadruplicado en los pocillos A1 + A2 y B1 + B2.
 - 4b. Pipetear 100 µl de cada muestra diluida en cuadruplicado en los pocillos subsiguientes.
 5. Cubra la placa con un sellador de placa e incube durante 2 horas (± 5 minutos) a 2-8°C.
 6. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos cuatro veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado refrigerado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante
 - 7a. Añadir 100 µl de marcador de enzima IgM kappa a la primera fila (A1, B1, C1 ...) de pocillos para cada muestra / control y
 - 7b. añadir 100 µl de marcador de enzima IgM lambda a la segunda fila de pocillos (A2, B2, C2 ...) para cada muestra / control
 8. Cubra la placa con un sellador de placa e incube durante 2 horas (± 5 minutos) a 2-8°C.
 9. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos cuatro veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado refrigerado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
- Importante: Deje que la solución sustrato de TMB alcance 18-28°C.**
10. Añada 100 µl de la solución sustrato de TMB (B-MAG-TMB) a cada pocillo
 11. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 800-1000 rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 30 ± 5 minutos a 18-28°C.
 12. Añada 100 µl de solución de interrupción (B-MAG-STTS) a todos los pocillos. Continúe con el paso 13 al cabo de 30 minutos como máximo.
 13. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS

Cálculo y de Cut-off

- Registre la absorbancia (OD) a 450 nm de cada muestra del paciente diluida.
- Calcular los valores medios duplicados.
- Para el cálculo compara OD [kappa] con OD [lambda]

$$Ratio = \frac{OD[kappa]}{OD[lambda]}$$

El punto de corte para monoclonalidad se establece de la siguiente manera (ver Figura 1):

kappa -luz cadena: Relación > 4
 lambda -luz cadena: Relación < 0,25

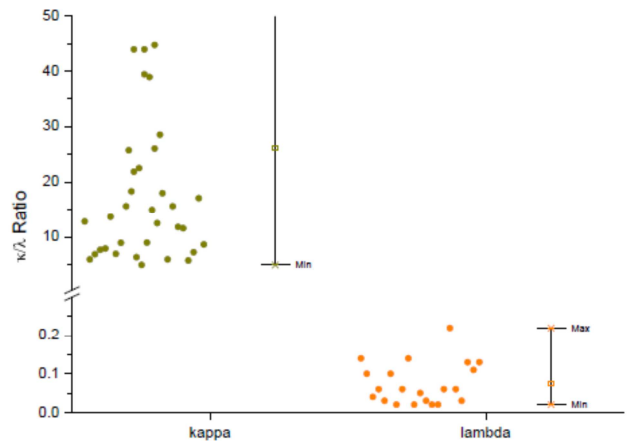


Figure 1: Quitard A et al; 2011. Determination of subtypes IgM kappa and IgM lambda in patients with an anti-MAG antibody neuropathy; 2011).

CONTROL DE CALIDAD

Es necesaria una completa comprensión de este prospecto para que el uso del producto dé unos resultados satisfactorios. Consulte también la información contenida en el prospecto de los anti-MAG ELISA (código de pedido EK-MAG).

Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente este prospecto.

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

Todos los controles deben encontrarse dentro de los límites de confianza establecidos. El isotipo de la muestra de control se imprime en la hoja de datos adicionales.

LIMITACIONES DE RENDIMIENTO

HEMOLISIS

Macroscópicamente muestras hemolizadas no deben utilizarse como se pueden obtener valores de ensayo más bajas.

SUERO LIPÉMICAS

Las muestras deben ser tomadas de individuos en ayunas.

REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ RÉFÉRENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

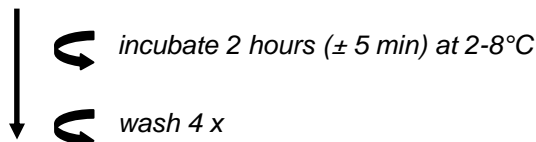
- [1] Kuijf ML, Eurelings M, Tio-Gillen AP, van Doorn PA, van den Berg LH, Hooijkaas H, Stork J, Notermans NC, Jacobs BC. Neurology. 2009 Sep 1; 73(9):688-95
- [2] Jaskowsky TD, Martins TB, Litwin CM, Hill HR. J Clin Lab Anal. 2004; 18(4): 247-50
- [3] Caudie C, Kaygisiz F, Jaquet P, Petiot P, Gonnaud PM, Antoine JC, Vial C. Ann Biol Clin (Paris). 2006 Jul-Aug; 64(4): 353-9.
- [4] Report of a Joint Task Force of the EFNS and the PNS. J Peripher Nerv Syst. 2010 Sep;15(3): 185-95.

kappa/lambda Reagent Set

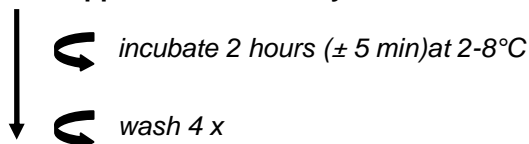
Precoated Microtiter Plate



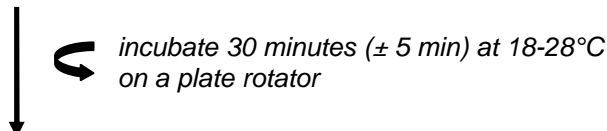
100 µL of Control or
Serum Samples (1:1000)



add 100 µL of Kappa or Lambda Enzyme Label



add 100 µL of TMB Substrate



add 100 µL of Stop Solution

→ Read absorbance at 450 nm (within 30 minutes)

TIME TO RESULT: 4.5 HOURS

SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
[EL IgM K]	Enzyme Label IgM kappa Enzymmarker IgM kappa Marqueur enzymatique IgM kappa Marcato enzimatico IgM kappa marcador enzimático IgM kappa

Symbol	Explanation
[EL IgM L]	Enzyme Label IgM lambda Enzymmarker IgM lambda Marqueur enzymatique IgM lambda Marcato enzimatico IgM lambda marcador enzimático IgM lambda

