



Anti-Glomerular Basement Membrane (GBM) Antibody ELISA

IVD

PRODUCT INSERT

REF 1154 Anti-Glomerular Basement Membrane (GBM) Antibody ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies in human serum. The presence of GBM antibodies can be used as an adjunct to clinical and other laboratory findings in the diagnosis of autoimmune renal disorders such as *Goodpasture's Syndrome*.

SUMMARY AND EXPLANATION

Rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) is a clinical syndrome developing over days or weeks characterized by crescentic glomerulonephritis on histopathology of the kidney. The prognosis is poor if not recognized early and if an appropriate treatment is not instituted. To optimize patient management, RPGN may be classified based on a) clinical assessment, b) direct immunofluorescence and electron microscopic studies of renal biopsy and c) serum antibody studies.

Using the above criteria, RPGN may be classified into a) immune complex mediated disease characterized by the presence of anti-DNA antibodies or anti-streptococcal antibodies, b) anti-glomerular basement membrane (GBM) mediated glomerulonephritis and Goodpasture's Syndrome and c) anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) associated glomerulonephritis. In a study by Jayne et al¹, of 889 RPGN suspected patients, 47 (5%) had anti-GBM, 246 (28%) had ANCA and 576 (65%) had neither antibodies. Two percent had both ANCA and anti-GBM antibodies.

Anti-GBM antibodies can be detected by indirect immunofluorescence or by ELISA²⁻¹⁰. The antigen associated with anti-GBM antibodies is a non-collagenous domain of collagen IV.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

The ELISA test is performed in microwells coated with purified GBM antigen. Controls, calibrators and patient serum samples are incubated in the microwells allowing anti-GBM antibodies present in the serum to bind to the antigen. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are incubated with an enzyme labeled anti-human IgG conjugate. Unbound conjugate is removed by washing the microwells. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of the substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in Enzyme Units per milliliter (EU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2°-8°C. **Do not freeze.**

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20°-25°C) prior to use.

When stored at 2°-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹¹.

EN

WARNING - Sodium azide (NaN_3) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use beyond expiration date on the label.

Materials provided

ImmulinTM Anti-Glomerular Basement Membrane (GBM) Antibody ELISA **REF** 1154

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Microplate with individual breakaway microwells coated with GBM antigen
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A GBM *	Ready to use Calibrator A (<i>green cap</i>). Human serum containing antibodies to GBM.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B GBM *	Ready to use Calibrator B (<i>violet cap</i>). Human serum containing antibodies to GBM.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C GBM *	Ready to use Calibrator C (<i>blue cap</i>). Human serum containing antibodies to GBM.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D GBM *	Ready to use Calibrator D (<i>yellow cap</i>). Human serum containing antibodies to GBM.
1 x 1.5 ml	CONTROL + GBM *	Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for GBM antibodies.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (<i>whitecap</i>). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
2 x 60 ml	DIL *	Ready to use Serum Diluent . Color coded blue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light.
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.

* Contains <0.1% NaN_3






Symbols used on labels:

LOT Lot number

REF Catalog number

 Use by

EN

-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 630 nm.
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

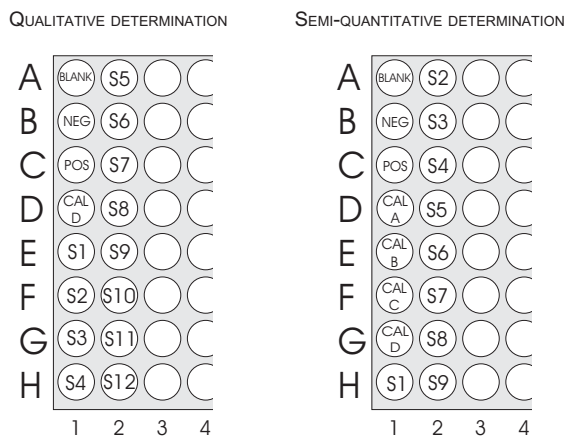
PROCEDURE

Procedural Notes

- Before starting with the assay read carefully the product insert.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate at room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Good washing technique is critical. If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.

Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate at room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use only the Ready to Use Low Calibrator D (*vial with yellow cap*). **or** For a **semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below.



- Step 4** Prepare a **1:201** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **1.0 ml** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder .
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples to the appropriate microwells as per protocol sheet.
Note: Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within 1 hour from adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/630nm dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations, the positive control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

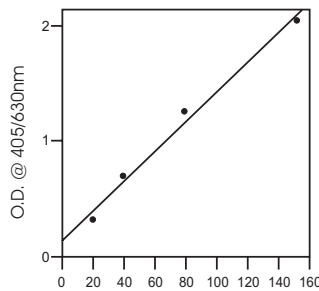
The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.



Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such serum sample should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values. These may vary with the population examined.

anti-GBM value	Interpretation
<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

EN

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The results obtained serve only as an aid in the diagnosis of GBM antibody mediated nephritis and *Goodpasture's Syndrome* and should not be interpreted as diagnostic in themselves. Serum of several patients with RPGN may be negative for anti-GBM antibodies

EXPECTED VALUES

Prevalance of anti-GBM Antibodies in different disease groups

Disease	No.	Negative	Positive	% Positive
Normals	120	120	0	0
Anti-GBM Nephritis	65	1	64	98.4
Systemic Vasculitis	40	38	1	2.5
Systemic Lupus Erythematosus	40	40	0	0
Rheumatoid Arthritis or Scleroderma	40	39	1	2.5



Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1154 Μέθοδος E Α για αντι σώματα κατά της πειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ) 96 Προ διορι μοί

ΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων κατά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒ) σε ορό ανθρώπου. Η παρουσία των αντισωμάτων κατά της ΣΒ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επικουρικό μέσο των κλινικών και άλλων εργαστηριακών ευρημάτων, για τη διάγνωση αυτοάνοσων νεφρικών διαταραχών όπως το *úνδρομο Goodpasture*.

ΕΡΙΑΛΗΨΗ ΚΑΙ Ε ΕΞΗΓΗΣΗ

Η ταχέως εξελι όμενη προοδευτική πειραματονεφρίτιδα (ΤΕΠΣ) είναι ένα κλινικό σύνδρομο που αναπτύσσεται εντός ημερών ή εβδομάδων και χαρακτηρίζεται από εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα στην ιστοπαθολογία του νεφρού. Εάν δεν αναγνωρισθεί έγκαιρα και δεν εφαρμοστεί η κατάλληλη θεραπεία, η πρόγνωση είναι κακή. Για τη βέλτιστη αντιμετώπιση των ασθενών, η ΤΕΠΣ μπορεί να ταξινομηθεί με βάση α) την κλινική αξιολόγηση, β) άμεσες μελέτες νεφρικής βιοψίας με ανοσοφθορισμό και ηλεκτρονική μικροσκοπία και γ) μελέτες αντισωμάτων στον ορό.

Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω κριτήρια, η ΤΕΠΣ μπορεί να ταξινομηθεί σε α) νόσο στην οποία διαμεσολαβούν ανοσοσύμπλοκα και χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντισωμάτων κατά του DNA ή κατά του στρεπτόκοκκου, β) σύνδρομο Goodpasture και σπειραματονεφρίτιδα στην οποία διαμεσολαβούν αντισώματα κατά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒ) και γ) σπειραματονεφρίτιδα σχετιζόμενη με κυτταροπλασματικά αντισώματα κατά των ουδετερόφιλων (ANCA). Σε μια μελέτη από τους Jaffe et al¹, από 889 ασθενείς με υποψία ΤΕΠΣ, 47 (5%) εμφάνισαν αντι-ΣΒ αντισώματα, 246 (28%) εμφάνισαν ANCA και 576 (65%) δεν εμφάνισαν κανένα από τα δύο αντισώματα. Δύο τοις εκατό των ασθενών εμφάνισαν τόσο ANCA όσο και αντι-ΣΒ αντισώματα.

Τα αντι-ΣΒ αντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν είτε με έμμεσο ανοσοφθορισμό είτε με ELISA²⁻¹⁰. Το αντιγόνο που σχετίζεται με τα αντι-ΣΒ αντισώματα είναι μια μη κολλαγνώδης περιοχή του κολλαγόνου IV.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση ELISA διεξάγεται σε μικροκυψελίδες επικαλυμμένες με κεκαθαρμένο αντιγόνο ΣΒ . Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στις μικροκυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση στο αντιγόνο όλων των αντι-ΣΒ αντισωμάτων του ορού. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν επωάζονται με ένα σημασμένο με ένζυμο συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος σε ένα έγχρωμο προϊόν αντίδρασης. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ενζύμου ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.**

η χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση.

EL

Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

ροφυλάξεις

Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹¹.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. ην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics, Inc. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μικροβιακής ή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό τους. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Υλικά που παρέχονται

έθοδος ELISA για αντισώματα κατά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒ) ImmuLisa™ REF 1154

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Λακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με αντιγόνο ΣΒ .
1 x 1 5 ml	CALIBRATOR A GBM *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής A (πρά ινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της ΣΒ .
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B GBM *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής B (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της ΣΒ .
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C GBM *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής C (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της ΣΒ .
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D GBM *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής D (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της ΣΒ .
1 x 1,5 ml	CONTROL + GBM *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για αντισώματα κατά της ΣΒ .
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
2 x 60 ml	DIL *	Έτοιμο προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος μπλε.

EL

1 x 12 ml **SUBSTRATE** *

Έτοιμο προς χρήση **ενζυμικό υπόστρωμα**. Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). **Να προστατεύεται από το φως.**

1 x 12 ml **STOP**

Έτοιμο προς χρήση **διάλυμα τερματισμού**.

2 x **BUF** **WASH**

Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃


Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

IVD In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα
- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικά χαρτιά
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 630 nm.
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο μακροχρόνια φύλαξη, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος.

- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών πρέπει να προετοιμαστούν προτού ξεκινήσει η ανάλυση.
- Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης. Εάν η έκπλυση δεν εκτελείται αυτόματα, επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας μια ισχυρή ριπή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από μια φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο κατά μήκος ολόκληρου του πλακιδίου. **Συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό, επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Σε όλα τα βήματα είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των χρόνων. Όλες οι περίοδοι επώασης ξεκινούν με την ολοκλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια σειρά.
- Αφαιρέστε από τη θήκη τις απαιτούμενες ταινίες μικροκυψελίδων και επανασφραγίστε προσεκτικά τη θήκη ώστε να αποτραπεί τυχόν συμπίκνωση υδατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.

Μέθοδος ανάλυσης

- Βήμα 1** Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Βήμα 2** Σημάνετε το φύλλο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στις μικροκυψελίδες. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.
- Βήμα 3** Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο τον έτοιμο προς χρήση Βαθμονομητή D (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα)
ή Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές A έως D, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διαμόρφωση δειγμάτων.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

- Βήμα 4** Προετοιμάστε μια αραιώση των δειγμάτων ασθενών σε αναλογία **1:201**, αναμιγνύοντας **5 μl** του δείγματος του ασθενούς με **1,0 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
- Βήμα 5** Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από τη θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες που υπάρχουν στη σφραγισμένη θήκη στο ψυγείο. Τοποθετήστε σταθερά τις μικροκυψελίδες στο πλαίσιο στήριξης που διατίθεται.
- Βήμα 6** Προσθέστε **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενών στις κατάλληλες μικροκυψελίδες, όπως υποδεικνύεται στο φύλλο πρωτοκόλλου.

EL

Σημείωση: Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μ** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. ηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου.

- Βήμα 7** Επώαστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** Εκπλύνετε **4x** με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας το πλακίδιο και κτυπώντας το ελαφρά ώστε να αδειάσουν όλες οι κυψελίδες ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κυψελίδα. Για να στυπώσετε στο τέλος της τελευταίας έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 10** Επώαστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 8.
- Βήμα 12** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 13** Επώαστε επί **30 λεπτά** (\pm 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός 1 ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 405/630 nm, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι $<0,3$. Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <20 EU/ml. Εάν η εξέταση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

A ΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων του ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

1. ΟΙΟΤΙΚΟΣ ΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος

----- X EU/ l του Βαθμονομητή D = EU/ l του εξεταζόμενου δείγματος

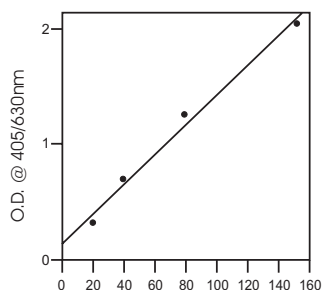
Απ/ση του Βαθμονομητή D

2. ΗΜΙ- ΟΣΟΤΙΚΟΣ ΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών A έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις

EL

συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης τους.



Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή Α. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν με το συντελεστή αραιώσης.

Ερμηνεία

Τα παρακάτω παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές. Οι τιμές αυτές ενδέχεται να ποικίλλουν σε κάθε πληθυσμό που εξετάζεται.

Τιμή αντι-ΣΒΜ	Ερμηνεία
<20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (οριακό)
>25 EU/ml	Θετικό

ΕΠΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται υποβοηθούν μόνο τη διάγνωση της νεφρίτιδας στην οποία διαμεσολαμβάνουν αντισώματα κατά της ΣΒ και του *υνδρόμου Goodpasture* και δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται από μόνα τους ως διαγνωστικά. Ο ορός αρκετών ασθενών με ΤΕΠΣ ενδέχεται να είναι αρνητικός για αντι-ΣΒ αντισώματα.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Συχνότητα εμφάνισης των αντι-ΣΒΜ αντισωμάτων σε διάφορες ομάδες της νόσου

Νόσος	Αρ.	Αρνητικοί	Θετικοί %	σοστό θετικών %
Φυσιολογικοί	120	120	0	0
Αντι-ΣΒ νεφρίτιδα	65	1	64	98,4
Συστηματική αγγειίτιδα	40	38	1	2,5
Συστηματικός ερυθ. λύκος	40	40	0	0
Ρευματοειδής αρθρίτιδα ή σκληροδερμία	40	39	1	2,5



ELISA para anticuerpos anti membrana basal glomerular (MBG)

IVD

PROSPECTO

REF 1154 ELISA para anticuerpos anti membrana basal glomerular (MBG) 96 an lisis

USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección y semicuantificación de anticuerpos anti membrana basal glomerular (MBG) en suero humano. La detección de anticuerpos anti MBG es una ayuda, junto con otros estudios de laboratorio y exámenes clínicos, en el diagnóstico de trastornos renales autoinmunes como el síndrome de Goodpasture.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP) es un síndrome clínico que evoluciona en días o semanas, caracterizado por glomerulonefritis crónica, como evidencia la histopatología del riñón. La prognosis no es buena si no hay un diagnóstico precoz de la enfermedad con consiguiente tratamiento. Para optimizar el tratamiento del paciente, la GNRP se puede diagnosticar basándose en a) exploraciones clínicas, b) estudios de una biopsia renal mediante inmunofluorescencia directa y microscopio electrónico y c) análisis de anticuerpos en suero.

Siguiendo los criterios antedichos, la GNRP puede clasificarse en a) enfermedad de complejos inmunes caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-ADN o anti-estreptococos; b) **Glomerulonefritis anti-membrana basal glomerular (MBG) y síndrome de Goodpasture** y c) **Glomerulonefritis asociada a anticuerpos anti-neutrófilo citoplásmico (ANCA)**. Según un estudio de Jayne et al¹ sobre 889 pacientes en que se sospechaba GNRP, 47 de ellos (5%) tenían anticuerpos anti-MBG, 246 (28%) presentaban ANCA, 576 (65%) no presentaban ninguno de los dos anticuerpos y el 2% tenían ambos anticuerpos, ANCA y anti-MBG.

Los anticuerpos anti MBG se detectan mediante inmunofluorescencia indirecta o mediante ELISA²⁻¹⁰. El antígeno asociado a los anticuerpos anti MBG es un dominio no colágeno del colágeno IV.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo ELISA se efectúa en pocillos recubiertos de antígeno MBG purificado. Controles, calibradores y muestra de suero del paciente se incuban en los pocillos permitiendo que los anticuerpos anti MBG presentes en el suero se unan al antígeno. Los anticuerpos no unidos y demás proteínas del suero se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se incuban con un conjugado de IgG antihumana marcado con enzima. Después de eliminar por lavado todo el conjugado que no se ha unido, se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP). La presencia de anticuerpos se detecta por el cambio de color provocado por la conversión del sustrato pNPP en un producto de reacción coloreado. Se detiene la reacción y con un espectrofotómetro se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración del anticuerpo. Los resultados se expresan en unidades ELISA (EU)/ml.

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. No los congele.

No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20°-25°C).

Conservado a 2-8°C, el tiempo de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tiempo de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

Precauciones

Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respete las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales¹¹.

ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN_3) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto. No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

Material suministrado









ELISA para anticuerpos anti membrana basal glomerular (MBG) ImmuLisa™ **REF** 1154

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Microplaca con micropocillos individuales separables revestidos con antígeno GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A GBM *	Calibrador A listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano con anticuerpos anti GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B GBM *	Calibrador B listo para usar (<i>tapa morada</i>). Suero humano con anticuerpos anti GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C GBM *	Calibrador C listo para usar (<i>tapa azul</i>). Suero humano con anticuerpos anti GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D GBM *	Calibrador D listo para usar (<i>tapa amarilla</i>). Suero humano con anticuerpos anti GBM.
1 x 1,5 ml	CONTROL + GBM *	Control positivo listo para usar (<i>tapa roja</i>). Contiene suero humano con anticuerpos anti GBM.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Control negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
2 x 60 ml	DIL *	Diluyente de suero listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Protéjase de la luz.
1 x 12 ml	STOP	Solución Stop lista para usar.
2 x	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.

* Contiene <0.1% NaN_3

Símbolos utilizados en las etiquetas:

-  N.º de lote
-  N.º de catálogo
-  Fecha de caducidad
-  Temperatura de conservación
-  Lea las instrucciones de uso
-  Para diagnóstico *in vitro*
-  Fabricante
-  N.º de análisis

Materiales necesarios no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido, o bien lavador automático de microplacas con capacidad de 200 µl
- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a **405 nm**. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interfieren en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO**Advertencias preliminares**

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente antes de dar comienzo a la prueba. Vuelva a poner de inmediato en la nevera los materiales y muestras no utilizados.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- Una buena técnica de lavado es crucial. Si efectúa el lavado manualmente, rocíe toda la microplaca con un fuerte chorro de solución de lavado, utilizando una botella de boca ancha. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El periodo de incubación empieza después de dispensar los reactivos.
- Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia.

ES

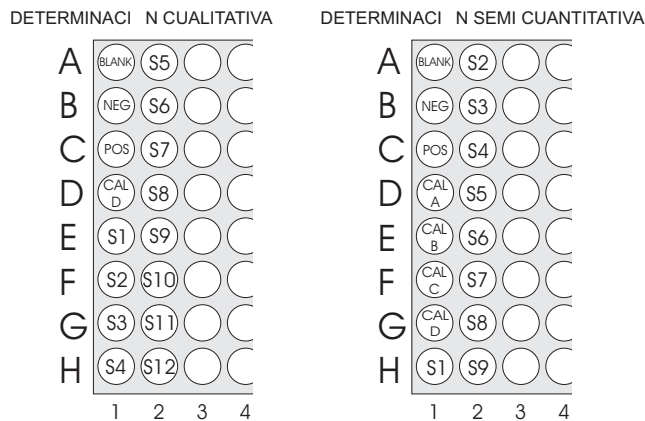
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y círralo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.

Procedimiento del ensayo

Paso 1 Los reactivos deben estar a temperatura ambiente.

Paso 2 Se ale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.

Paso 3 Para la **determinación cualitativa**, use únicamente el Low Calibrator D (*vial de tapa amarilla*) listo para usar. Para la **Determinación semi cuantitativa**, use los calibradores de A a D listos para usar como se muestra en el ejemplo siguiente:



Paso 4 Prepare una dilución de **1:201** de la muestra del paciente, mezclando **5 µl** de suero con **1,0 ml** de diluyente de suero.

Paso 5 Coja los pocillos necesarios del sobre, círralo bien y pégalo nuevamente en la nevera de inmediato. Ponga los pocillos en el soporte suplementario.

Paso 6 Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, controles positivo y negativo y muestras de paciente en los correspondientes pocillos, como se indica más arriba en el esquema.

Nota: Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo.

Paso 7 Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 8 Lave **4 veces** con el tampón de lavado. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Elimine el líquido invirtiendo y sacudiendo el pocillo, o bien aspire el líquido de cada pocillo. Al terminar el último lavado, invierta las tiras y sacúdalas en rígidamente sobre papel absorbente. Si utiliza un lavador automático, programe el ciclo de lavado siguiendo las instrucciones del fabricante.

Paso 9 Pipetee **100 µl** de conjugado en los pocillos.

Paso 10 Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 11 Lave los pocillos repitiendo el paso 8.

Paso 12 Pipetee **100 µl** de sustrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.

Paso 13 Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 14 Pipetee **100 µl** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el sustrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de una hora después de haber añadido la solución Stop.

ES

Paso 15 Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630nm comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser <0,3. La lectura de absorbancia del calibrador A no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de ambas lecturas para determinar las EU/ml. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la absorbancia del calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

RESULTADOS

Cálculo

Las concentraciones en la muestra del paciente se pueden determinar mediante dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

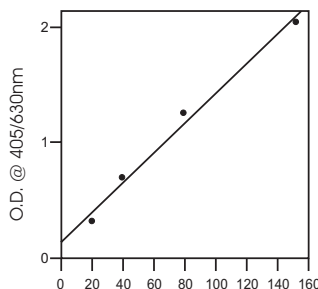
Abs. de muestra analizada

$$X \text{ EU/ml de Calibrador D} = \text{EU/ml muestra analizada}$$

Abs. de Calibrador

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en EU/ml en el eje X contra la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.



Calibrador

Los calibradores listos para usar proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrán dar valores de absorbancia superiores a los del calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales, que podrán variar según la población examinada.

Valor anti-MBG	Interpretación
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Incierto (valores límite)
>25 EU/ml	Positivo

ES

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los resultados obtenidos se utilizarán sólo como ayuda en el diagnóstico de nefritis por anticuerpos MBG y síndrome de Goodpasture; no deben considerarse como un diagnóstico por sí solos. Algunos pacientes con **GNRP podrán resultar negativos a anticuerpos anti MBG.**

VALORES ESPERADOS

Prevalencia de anticuerpos anti-MBG en grupos de pacientes con diferentes enfermedades

Enfermedad	No.	Negativo	Positivo	% Positivo
Normales	120	120	0	0
Nefritis anti MBG	65	1	64	98,4
Vasculitis sistémica	40	38	1	2,5
Lupus eritematoso sistémico	40	40	0	0
Atritis reumatoide e esclerodermia	40	39	1	2,5



Anti-glomerul re-Basalmembran-Antik rper-ELISA (GBM)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1154 Anti-glomerul re-Basalmembran-Anti rper-ELISA (GBM) 96 Bestimmungen

VERWENDUNGS WECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) f r den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von Antik rpern gegen die glomerul re Basalmembran (GBM) in Humanserum. Das Vorhandensein von GBM-Antik rpern kann als zus tzliches Element zu klinischen und anderen Laborbefunden bei der Diagnose von autoimmunen Nierenerkrankungen, z.B. *Goodpasture-Syndrom*, verwendet werden.

USAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Rapid progressive Glomerulonephritis (RPGN) ist ein klinisches Syndrom, das sich ber Tage oder Wochen hin entwickelt und bei einer Histopathologie der Niere durch eine halbmondf r mige Glomerulonephritis gekennzeichnet ist. Die Prognose ist schlecht, wenn die Krankheit nicht fr h erkannt und eine angemessene Behandlung eingeleitet wird. Um das Patientenmanagement zu optimieren, kann RPGN auf der Grundlage von a) klinischer Beurteilung, b) direkter Immunfluoreszenz und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Nierenbiopsie und c) Serumantik rpertests klassifiziert werden.

Unter Verwendung der obigen Kriterien kann RPGN wie folgt klassifiziert werden: a) Immunkomplex-vermittelte Erkrankung, die durch das Vorhandensein von Anti-DNA-Antik rpern oder Anti-Streptokokken-Antik rpern gekennzeichnet ist, b) durch Antik rper gegen die glomerul re Basalmembran (GBM) vermittelte Glomerulonephritis und Goodpasture-Syndrom und c) mit antineutrophilen zytoplasmatischen Antik rpern (ANCA) verbundene Glomerulonephritis. In einer Studie von Jayne et al¹ hatten von 889 Patienten, bei denen ein Verdacht auf RPGN bestand, 47 (5%) Anti-GBM-Antik rper, 246 (28%) ANCA und 576 (65%) keinen der beiden Antik rper. Bei zwei Prozent wurden sowohl ANCA als auch Anti-GBM-Antik rper gefunden.

Anti-GBM-Antik rper k nnen durch indirekte Immunfluoreszenz oder ELISA nachgewiesen werden²⁻¹⁰. Das mit Anti-GBM-Antik rpern verbundene Antigen ist eine nicht-kollagene Dom ne von Kollagen IV.

TESTPRIN IP

Der ELISA-Test wird in Mikrotiterplattenvertiefungen durchgef hrt, die mit gereinigtem GBM-Antigen beschichtet sind. Kontrollseren, Kalibratoren und Serumproben vom Patienten werden in den Vertiefungen inkubiert; dies erm glicht die Bindung der im Serum vorhandenen Anti-GBM-Antik rper an das Antigen. Nicht gebundene Antik rper und andere Serumeiwei e werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Gebundene Antik rper werden mit einem enzymmarkierten Anti-human-IgG-Konjugat inkubiert. Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Anschlie end wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antik rpern wird mittels einer Farbver nderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensit t der Farbver nderung, welche proportional zur Konzentration der Antik rper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in Enzym-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben.

REAGEN IEN

Lagerung und ubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.**

Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es tr b ist oder Partikel enth lt. Alle Reagenzien m ssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.

Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren

DE

Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

Vorsichtmaßnahmen

Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹¹.

WARNUNG – Natriumazid (NaN₃) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anheftung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

ImmuliSia™ Anti-glomeruläre-Basalmembran-Antikörper-ELISA (GBM) REF 1154

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen

12 x 8	MICROPLATE GBM	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit GBM-Antigen beschichtet
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A GBM *	Gebrauchsfertiger Kalibrator A (grüneappe). Humanserum mit Antikörpern gegen GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B GBM *	Gebrauchsfertiger Kalibrator B (lilaappe). Humanserum mit Antikörpern gegen GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C GBM *	Gebrauchsfertiger Kalibrator C (blaueappe). Humanserum mit Antikörpern gegen GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D GBM *	Gebrauchsfertiger Kalibrator D (gelbeappe). Humanserum mit Antikörpern gegen GBM.
1 x 1,5 ml	CONTROL + GBM *	Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (roteappe). Enthält GBM-Antikörper-positives Humanserum.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (weißeappe). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
2 x 60 ml	DIL *	Gebrauchsfertiger Serumverdüner . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Gebrauchsfertiges Enzymsubstrat . Enthält pNPP. Vor Licht schützen.

DE

1 x 12 ml **STOP**

Gebrauchsfertige **Stopplösung**.

2 x **BUF** **WASH**

Waschpuffer in Pulverform. Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.


* Enthält <0,1% NaN_3

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

LOT Chargennummer

REF Bestellnummer

 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

IVD In-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 630 nm eingestellt werden.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipidreiche oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig den Beipacktext, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens, bis die Serumproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht haben. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.

DE

- Eine gute Waschmethode ist unerlässlich. Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschpuffer über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.

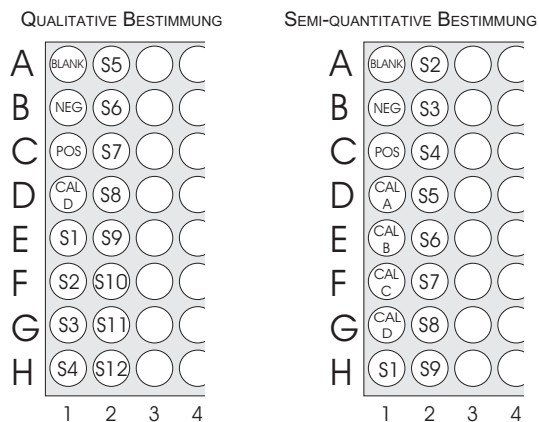
Testmethode

Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

Schritt 2 Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.

Schritt 3 Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen niedrigen Kalibrator D (*Flißchen mit gelber Spitze*).

oder Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis D, wie in der Probenanordnung unten angezeigt.



Schritt 4 Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:201**, indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **1,0 ml** Probenverdüner vermischen.

Schritt 5 Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Vertiefungen sicher in den mitgelieferten Halter ein.

Schritt 6 Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.

Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdüner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null.

Schritt 7 Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

Schritt 8 Waschen Sie **viermal** mit Waschpuffer. Wenn Sie manuell waschen, füllen Sie jede Vertiefung mit

rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

- Schritt 9** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 10** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 11** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.
- Schritt 12** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 13** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 14** Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie die Extinktionswerte innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.
- Schritt 15** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und die Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte <0,3 sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die EU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE

Berechnungen

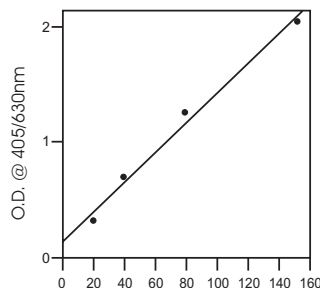
Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

$$\frac{\text{Ext. der Testprobe}}{\text{Ext. von Kalibrator D}} \times \text{EU/ml von Kalibrator D} = \text{EU/ml der Testprobe}$$

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.



DE

Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte zu bestimmen, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen. Diese können je nach der untersuchten Patientenpopulation schwanken.

Anti-GBM-Wert	Interpretation
<20 EU/ml	negativ
20-25 EU/ml	unbestimmt (Grenzbereich)
>25 EU/ml	positiv

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Die erhaltenen Ergebnisse dienen nur als Hilfsmittel bei der Diagnose von durch GMB-Antikörper vermittelter Nephritis und *Goodpasture-Syndrom* und sollten nicht allein als diagnostisch gedeutet werden. Das Serum einiger Patienten mit RPGN kann negativ für Anti-GBM-Antikörper sein.

ERWARTETE WERTE

Vorkommen von Anti-GBM-Antikörpern in verschiedenen Krankheitsgruppen

Krankheit	Anzahl	Negativ	Positiv	% Positiv
Normale Testpersonen	120	120	0	0
Anti-GBM-Nephritis	65	1	64	98,4
Systemische Vaskulitis	40	38	1	2,5
Systemischer Lupus erythematodes	40	40	0	0
Rheumatoide Arthritis oder Sklerodermie	40	39	1	2,5



Anti-corps de la membrane basale glomérulaire (GBM) ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1154 Anticorps anti-membrane basale glomérulaire (GBM) ELISA 96 ests

USAGE PR VU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA, destinée à la détection et à la semi-quantification des anticorps anti-membrane basale glomérulaire (GBM) dans le sérum humain. La présence d'anticorps de la membrane basale glomérulaire (GBM) peut être utilisée comme un élément complémentaire par rapport aux conclusions cliniques et aux autres conclusions de laboratoire dans le cours du diagnostic des troubles rénaux autoimmuns tel que le Syndrome de Goodpasture.

R SUM ET EXPLICATION

La glomérulonéphrite rapidement progressive (RPGN) est un syndrome clinique se développant sur quelques semaines ou quelques mois, caractérisée par une glomérulonéphrite croissante sur l'histopathologie du rein. Le pronostic est défavorable si la maladie n'est pas reconnue tôt et si un traitement approprié n'est pas institué. Pour optimiser la gestion du patient, la RPGN peut être classée en ayant recours a) une évaluation clinique b) une immunofluorescence directe et des études au microscope électronique de la biopsie rénale et c) études des anticorps du sérum.

Lorsque l'on a recours aux critères précités, la glomérulonéphrite rapidement progressive peut être classée en a) une maladie médiée par des complexes immuns, caractérisée par la présence d'anticorps anti-ADN ou d'anticorps anti-streptococciques b) glomérulonéphrite et Syndrome de Goodpasture médiés par des anticorps anti-membrane basale glomérulaire (GBM) et c) glomérulonéphrite associée à des anticorps antineutrophile cytoplasmique (ANCA). Dans une étude de Jayne et al¹, sur 889 patients chez qui on soupçonne une RPGN, 47 (5%) avait des anticorps anti-membrane basale glomérulaire (GBM), 246 (28%) avait des anticorps antineutrophile cytoplasmique ANCA et 576 (65%) n'avait aucun anticorps. Deux % avaient aussi bien des anticorps ANCA que GBM.

Les anticorps anti-GBM peuvent être détectés par l'immunofluorescence indirecte ou par une méthode de dosage immunoenzymatique de type ELISA²⁻¹⁰. L'antigène associé avec les anticorps anti-membrane basale glomérulaire est un domaine non-collagène du collagène IV.

PRINCIPES DE LA METHODE

Le test ELISA est réalisé dans des micropuits enduits d'antigène GBM purifié. Les régulateurs, les calibreurs et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits en permettant aux anticorps anti-GBM qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner à l'antigène. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps agglutinés sont incubés avec un conjugué d'anticorps marquant enzymatique pour l'IgG humain. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage des micropuits. La phosphatase alcaline et son substrat (pNPP) est ensuite ajoutée aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion du substrat vers un produit de réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités enzyme par millilitre (EU/ml).

R ACTIFS

Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2°-8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20°-25°C) avant l'usage.

Quand elle est entreposée à 2°-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration du kit. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Les bandes des microplaques puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

Précautions

Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux¹¹.

AVERTISSEMENT – L'azide de sodium (NaN_3) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal, qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources, si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue d'Immco Diagnostics Inc. Il faut respecter de bonnes pratiques de laboratoire pour limiter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs au moment de la manipulation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Matériel fourni

Anticorps anti-membrane basale glomérulaire (GBM) Immulisa™ ELISA **REF** 1154

Les kits contiennent des réactifs en suffisance pour procéder à 96 tests.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Microplaques avec micropuits individuels séparables enduits d'antigène membrane glomérulaire.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A GBM *	Calibreur A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant des anticorps de l'antigène GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B GBM *	Calibreur B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant des anticorps de l'antigène GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C GBM *	Calibreur C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant des anticorps de l'antigène GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D GBM *	Calibreur D (<i>couvercle jaune</i>) prêt à l'emploi. Sérum humain contenant des anticorps de l'antigène GBM.
1 x 1,5 ml	CONTROL + GBM *	Régulation positive prête à l'emploi (<i>couvercle rouge</i>). Contient du sérum humain positif pour les anticorps IgG anti-GBM.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Régulation Négative prête à l'emploi (<i>couvercle blanc</i>). Contient du sérum humain.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugué phos. alc. Anti-IgG humain prêt à l'emploi. Codé en couleur rose.
2 x 60 ml	DIL *	Diluant de sérum prêt à l'emploi. Codé en couleur bleue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrat d enzyme prêt à l'emploi. Contient du pNPP. Conserver à l'abri de la lumière.

FR

1 x 12 ml 

Solution d'arrêt pour l'emploi.

2 x  

Poudre **Wash Buffer** (solution de lavage). Reconstituer en un litre chacun.

* Contient <0.1% NaN₃

Symboles utilisés sur les étiquettes:

 Numéro de lot

 Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

 Pour usage diagnostique In vitro

 Fabricant

 Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl – 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes de test
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption 405 nm. Si un lecteur de microplaque double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé 630 nm.
- Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

R COLTE DES SP CIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROC DURE

Notes de procédure

- Avant de commencer l'essai, il faut lire avec soin la brochure qui accompagne le produit.
- Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test à température ambiante avant d'entreprendre la procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.

- Toutes les dilutions des échantillons des patients devraient être préparées avant de commencer l'essai.
- Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. Si le lavage est réalisé manuellement, il est fait de manière adéquate en dirigeant un flux puissant de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large travers toute la microplaque. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit avoir lieu au même taux et selon la même séquence.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.

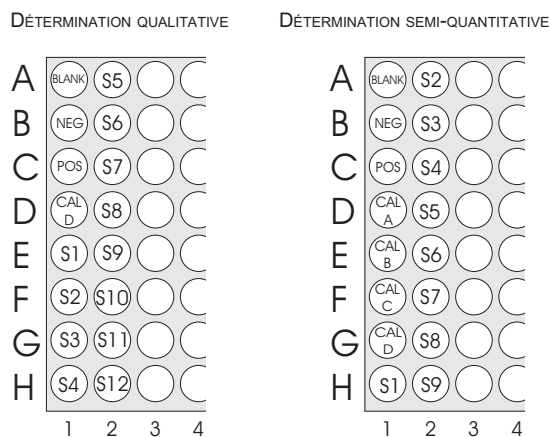
Méthode de test

tape 1 Laisser tous les réactifs et les spécimens atteindre la température ambiante.

tape 2 Étiqueter la feuille de protocole pour indiquer le placement de l'échantillon dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.

tape 3 Pour une **détermination qualitative**, utiliser seulement le Calibreur Bas D prêt à l'emploi (*à utiliser avec couvercle jaune*).

ou Pour un **dosage semi-quantitatif**, utiliser les Calibreurs A à D prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.



tape 4 Préparer une dilution **1:201** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **1.0 ml** de diluant de sérum.

tape 5 Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.

tape 6 Pipeter **100 µl** des calibreurs prêts à l'emploi, des régulateurs positifs et négatifs et des échantillons patients dilués dans les puits appropriés conformément au feuillet de protocole.

Note : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif à blanc. Mettre le lecteur ELISA à zéro par rapport au réactif à blanc.

tape 7 Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

- tape 8** Laver **4x** avec de la solution de lavage. En cas de lavage manuel, remplir chaque puits avec de la solution de lavage reconstituée. Éliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Dans le cas de dispositifs automatiques de lavage, programmer le dispositif de lavage en suivant les instructions du fabricant.
- tape 9** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.
- tape 10** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- tape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 8.
- tape 12** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrer comme pour le conjugué.
- tape 13** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- tape 14** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puits, en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.
- tape 15** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

Contr le de qualité

Des calibres, des régulateurs positif et négatif et un réactif à blanc doivent être utilisés à chaque essai pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif à blanc doit être inférieure à 0,3. Le calibre A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures devrait être prise pour déterminer EU/ml. Quand on procède aux dosages qualitatifs, la densité optique du Calibre D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs s'inscrivant dans la plage figurant sur la fiole.

R SULTATS

Calculs

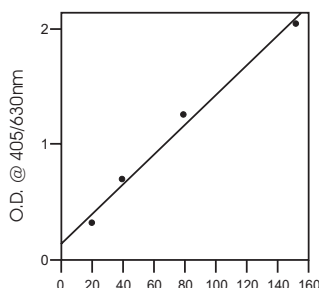
Les concentrations des échantillons de patient peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

1. DOSAGE QUALITATIF

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon d'essai}}{\text{Abs. du calibre D}} \times \text{EU/ml du calibre D} = \text{EU/ml échantillon de test}$$

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption du Calibre A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe optimale. Déterminer les concentrations des échantillons de patient de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption correspondante.



FR

Calibreur

Les calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patient qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux du calibreur A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe du calibreur quand on refait l'essai. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

Interprétation

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales. Celles-ci peuvent varier en fonction de la population examinée.

Valeur anti-GBM Interprétation

<20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	Indéterminé (cas limite)
>25 EU/ml	Positif

LIMITES DE LA PROC DURE

Les résultats obtenus servent seulement comme aide dans le diagnostic de la néphrite médiée par anticorps GBM et du syndrome de Goodpasture et ne devraient pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes. Le sérum de plusieurs malades souffrant de glomérulonéphrite rapidement progressive peut être négatif aux anticorps anti-membrane basale glomérulaire (GBM)

VALEURS ATTENDUES

Prévalence d anticorps anti-GBM dans les différents groupes de maladie

Incidence maladie	N°	Négatif	Positif	% Positif
Patients normaux	120	120	0	0
Néphrite anti-GBM	65	1	64	98.4
Vascularité systémique	40	38	1	2.5
Lupus systémique érythémateux	40	40	0	0
Polyarthrite rhumatoïde ou sclérodémie	40	39	1	2.5



Test Anticorpi Anti-membrana Basale del Glomerulo (GBM) ELISA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1154 Test Anticorpi Anti-membrana Basale del Glomerulo (GBM) ELISA 96 Determinazioni

FINALITA D USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la rilevazione e la semiquantificazione di anticorpi anti-membrana basale del glomerulo (GBM) nel siero umano. Il dato della presenza di anticorpi anti-GBM pu essere usato in aggiunta alle evidenze cliniche e ai risultati di altre analisi di laboratorio nella diagnosi dei disturbi renali autoimmuni come la sindrome di Goodpasture.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La glomerulonefrite a progressione rapida (RPGN) è una sindrome clinica che si sviluppa in giorni o settimane, caratterizzata da glomerulonefrite a semilune visibile mediante istopatologia del rene. La prognosi è scarsa se la malattia non viene riconosciuta precocemente e se non viene istituito un trattamento appropriato. Per ottimizzare la gestione del paziente, la RPGN pu essere classificata sulla base di a) valutazione clinica, b) studi per immunofluorescenza e microscopia elettronica di biopsie renali e c) studi per gli anticorpi nel siero.

Avvalendosi dei criteri sopracitati, la RPGN pu essere classificata come a) una patologia mediata da complesso autoimmune caratterizzata dalla presenza di anticorpi anti-DNA o anti-streptococchi, b) glomerulonefrite e sindrome di Goodpasture mediate da anticorpi anti-membrana basale del glomerulo (GBM) e c) glomerulonefrite associata ad anticorpi anti-neutrofili citoplasmatici (ANCA). In uno studio condotto da Jayne et al¹, degli 889 pazienti con sospetta RPGN, 47 (5%) presentava anticorpi anti-GBM, 246 (28%) anticorpi ANCA e 576 (65%) nessuno dei due anticorpi, mentre il 2% aveva anticorpi ANCA e anti-GBM.

Gli anticorpi anti-GBM possono essere individuati per immunofluorescenza indiretta o con il metodo ELISA²⁻¹⁰. L'antigene associato con gli anticorpi anti-GBM è un dominio IV non collagenico del collagene.

PRINCIPI DELLA METODICA

Il Test anti-GBM ELISA viene eseguito in pozzetti rivestiti con antigene GBM purificato. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, e ci permette agli anticorpi anti-GBM presenti nel siero di legarsi all'antigene. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati sono incubati con coniugato anti IgG umane marcato con un enzima. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi viene rivelata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato in un derivato colorato della reazione. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in unità di enzima per millilitro (EU/ml).

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.**

Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso.

Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

Precauzioni

Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono

essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹¹.

ATTENZIONE L'azide sodica (NaN₃) pu reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica pu essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Seguire una buona prassi di laboratorio per ridurre al minimo la contaminazione microbica e crociata di reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Materiali forniti

Test Anti-membrana Basale del Glomerulo (GBM) ELISA Immulisa™ **REF** 1154

Il kit contiene reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A GBM *	Calibratore A (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B GBM *	Calibratore B (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C GBM *	Calibratore C (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D GBM *	Calibratore D (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-GBM.
1 x 1,5 ml	CONTROL + GBM *	Controllo Positivo (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per anticorpi anti-GBM.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umane pronto all'uso ; di colore rosa.
2 x 60 ml	DIL *	Diluyente siero pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato Enzimatico pronto all'uso . Contiene pNPP. Proteggere dalla luce.
1 x 12 ml	STOP	Soluzione di Stop pronta all'uso.
2 x	BUF WASH	Tampone di Lavaggio in polvere. Da ricostituire a 1 litro ciascuno.

* Contiene < 0,1% NaN₃

Simboli usati sulle etichette:

LOT Numero di lotto

REF Numero catalogo

IT



Scadenza



Temperatura di conservazione



Leggere le istruzioni per l'uso



Usò diagnostico in vitro



Produttore



Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 630 nm.
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

RACCOLTA DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

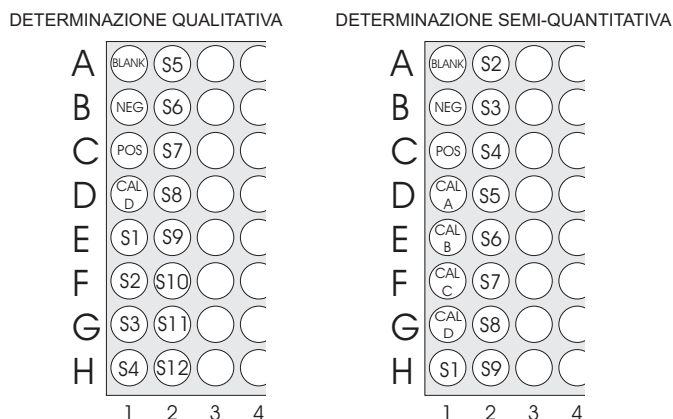
PROCEDURA

Note sul test

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastra. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta pi rapida e il tempo di incubazione pi uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta di reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.

Metodo del test

- Fase 1** Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Fase 3** Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Low Calibrator D pronto all'uso (fiala con tappo giallo). **mentre** per una determinazione **semi-quantitativa** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso come illustrato nell'esempio di disposizione riportato sotto:



- Fase 4** Preparare una diluizione **1:201** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **1,0 ml** di Diluente del Siero.
- Fase 5** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.
- Fase 6** Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.
Nota: Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco.
- Fase 7** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 9** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 8.
- Fase 12** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 14** Pipettare **100 µl** di Soluzione di stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Fase 15** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo di Qualit

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere <0,3. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore <20 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le EU/ml si deve prendere la media delle due letture. Se si eseguono le determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore dell'assorbanza del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA:

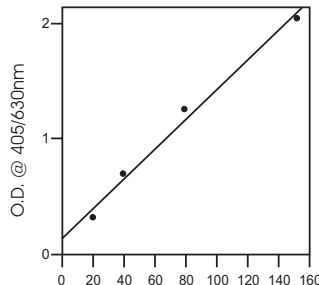
Assorbanza del campione del test

----- X EU/ml del Calibratore D = EU/ml del Campione

Assorbanza del calibratore D

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.



Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo pi alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali che possono variare in base alla popolazione esaminata.

Valore anti-GBM Interpretazione

<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminato (Borderline)
>25 EU/ml	Positivo

IT

LIMITAZIONI DEL TEST

I risultati ottenuti rappresentano unicamente un elemento di supporto alla diagnosi della nefrite mediata da anticorpi anti-GBM e della sindrome di Goodpasture, considerati singolarmente non hanno valenza diagnostica. I sieri di alcuni pazienti con RPGN possono risultare negativi agli anticorpi anti-GBM.

VALORI ATTESI

Prevalenza di anticorpi anti-GBM in diversi gruppi patologici

Patologia	N.	Negativo	Positivo	% Positivo
Normali	120	120	0	0
Nefrite	65	1	64	98,4
Anti-GBM				
Vasculite sistemica	40	38	1	2,5
Lupus eritematoso				
Sistemico	40	40	0	0
Artrite reumatoide				
o Sclerodermia	40	39	1	2,5



ELISA para Anticorpos Anti-Membrana Basal Glomerular (GBM)

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1154 ELISA para Anticorpos Anti-Membrana Basal Glomerular (GBM) 96 Determinações

APLICAÇÃO

É um teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a detecção e semiquantificação de anticorpos anti-membrana basal glomerular (GBM) em soro humano. A presença de anticorpos GBM pode ser usada como auxiliar em exames clínicos ou laboratoriais para o diagnóstico de doenças renais auto-imunes, tais como a Síndrome de Goodpasture.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A *Glomerulonefrite progressiva rápida* (RPGN) é uma síndrome clínica que se desenvolve em dias ou semanas e que é caracterizada por uma Glomerulonefrite crescente na histopatologia do rim. O prognóstico é mau se não for reconhecida precocemente e se não tiver sido iniciado um tratamento apropriado. Para otimizar o tratamento do doente, a RPGN pode ser classificada com base em a) exame clínico, b) imunofluorescência directa e exames ao microscópio electrónico de uma biópsia renal e c) exames de anticorpos no soro.

Usando os critérios acima mencionados, a RPGN poderá ser classificada como a) doença mediada por complexos imunes caracterizada pela presença de anticorpos anti-ADN ou anticorpos anti-estreptococos, b) glomerulonefrite mediada por anticorpos anti-membrana basal glomerular (GBM) e Síndrome de Goodpasture e c) glomerulonefrite associada a anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA). Num estudo de Jaime et al¹, de 889 doentes suspeitos de RPGN, 47 (5%) tinham anticorpos anti-GBM, 246 (28%) tinham ANCA e 576 (65%) não tinham nenhuns anticorpos. Dois por cento tinham ambos os anticorpos ANCA e anti-GBM.

Os anticorpos Anti-GBM podem ser detectados por imunofluorescência indirecta ou por ELISA²⁻¹⁰. O antígeno associado com os anticorpos anti-GBM é um domínio não-colagénico de colagénio IV.

PRINCÍPIOS DO MÉTODO

O teste ELISA é efectuado em micropoços revestidas com antígeno GBM purificado. Os Controlos, os calibradores e as amostras de soro do doente são incubados nos micropoços permitindo que os anticorpos anti-GBM presentes no soro se liguem ao antígeno. Os anticorpos que não se ligam e as outras proteínas do soro são eliminadas lavando os micropoços. Os anticorpos que se ligam são incubados com um conjugado de IgG anti-humana marcado com enzima. O conjugado que não tiver aderido é eliminado lavando os micropoços. Depois junta-se um substrato enzimático específico (pNPP) aos micropoços e a presença de anticorpos é detectada por uma mudança de cor provocada pela conversão do substrato num produto de reacção, colorido. A reacção é interrompida e muda a intensidade da cor, a qual será proporcional à concentração de anticorpos, lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são indicados em Unidades de Enzima por mililitros (UE/ml).

REAGENTES

Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. Não congele.

Não use o reagente se não estiver límpido ou se apresentar um precipitado. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20 a 25 °C) antes do uso.

Quando conservados entre 2 e 8 °C, o tempo de lavagem reconstituído permanecerá estável até à data de validade do kit. Reconstitua o tempo de lavagem em 1 litro de água destilada ou desionizada. As tiras de micropoços revestidos só devem ser usadas uma vez.

Precauções

Todos os componentes de origem humana usados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram

resultado negativo nos testes recomendados pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e as amostras dos doentes devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Respeite as normas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação desses materiais¹¹.

CUIDADO - A azida de sódio (NaN_3) pode reagir com as canalizações de chumbo e de cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Para a eliminação dos líquidos, lave com grandes quantidades de água para evitar a formação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Em caso de ingestão, informe imediatamente o director do laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

As instruções devem ser respeitadas exactamente como estão indicadas no folheto do kit para assegurar a obtenção de resultados válidos. Não trocar os componentes do kit por outros de origens diferentes do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Respeite as normas laboratoriais em vigor para reduzir a possibilidade de contaminação microbiana ou cruzada dos reagentes durante o manuseamento. Não usar após a data de validade indicada no rótulo.

Materiais fornecidos

ELISA para Anticorpos Anti-Membrana Basal Glomerular (GBM) ImmuLisa™ **REF** 1154









Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A GBM *	Calibrador A pronto a usar (<i>tampa verde</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B GBM *	Calibrador B pronto a usar (<i>tampa violeta</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C GBM *	Calibrador C pronto a usar (<i>tampa azul</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-GBM.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D GBM *	Calibrador D pronto a usar (<i>tampa amarela</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-GBM.
1 x 1,5 ml	CONTROL + GBM *	Controlo positivo pronto a usar (<i>tampa vermelha</i>). Contém soro humano positivo para anticorpos anti-GBM.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo pronto a usar (<i>tampa branca</i>). Contém soro humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa.
2 x 60 ml	DIL *	Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	STOP	Solução de paragem pronta a usar.
2 x	BUF WASH	Tampão de lavagem em pó. Reconstituir cada unidade em um litro.

* Contém <0,1% NaN_3

PT

Símbolos utilizados nos rótulos:

-  N.º mero de lote
-  N.º mero de catálogo
-  Prazo de validade
-  Temperatura de armazenamento
-  Ler as instruções de utilização
-  Utilização em diagnóstico in vitro
-  Fabricante
-  N.º mero de testes

Materiais necessários mas não fornecidos

- Água desionizada ou destilada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade de 5 a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorvente
- Leitor de microplacas capaz de ler valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado em 630 nm.
- Lavador automático de microplacas capaz de distribuir 200 µl

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Só devem ser usadas amostras de soro neste método. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com contaminação microbiana podem interferir com o desempenho do teste e portanto não devem ser utilizadas. Conserve as amostras entre 2 e 8 C por não mais de uma semana. Para uma conservação mais prolongada, as amostras de soro devem ser congeladas. Evite congelar e descongelar as amostras repetidamente.

MODO DE PROCEDER

Notas sobre o modo de proceder

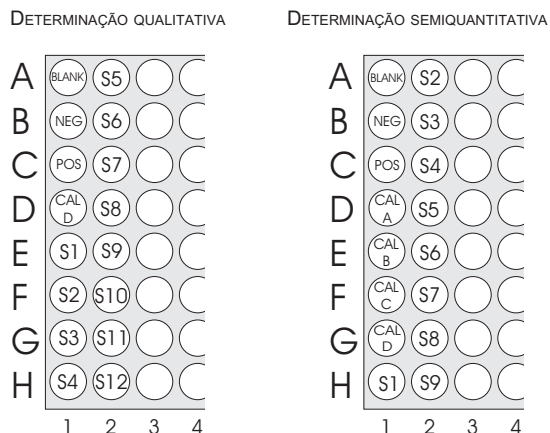
- Antes de iniciar o teste leia atentamente o folheto do produto.
- Deixe que as amostras de soro e os reagentes de teste alcancem a temperatura ambiente antes de iniciar o teste. Guarde imediatamente no frigorífico as amostras e os reagentes não usados.
- Todas as diluições das amostras dos doentes devem ser preparadas antes de iniciar o teste.
- É fundamental uma boa técnica de lavagem. Se a lavagem for efectuada manualmente, a melhor forma de efectuar essa lavagem é a de deitar um forte fluxo de tampão de lavagem com um frasco de lavagem de boca larga ao longo de toda a microplaca. **Aconselha-se o uso de um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal capaz de distribuir em 8 poços simultaneamente. Isso torna o processo mais rápido e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante um controlo do tempo. O início de todos os períodos de incubação dá-se quando se adiciona o reagente.

PT

- O adição de todas as amostras e reagentes deve ser efectuado com o mesmo intervalo e na mesma sequência.
- Retire as tiras de micropoços necessárias do pacote e depois feche-as bem para evitar a condensação nos poços não usados. Guarde o pacote imediatamente no frigorífico.

Método do teste

- Passo 1** Deixe que todos os reagentes e as amostras dos doentes alcancem a temperatura ambiente.
- Passo 2** Preencha a folha de protocolo para indicar a disposição das amostras nos poços. É laboratorialmente aconselhável processar as amostras em duplicado.
- Passo 3** Para uma **determinação qualitativa**, use exclusivamente o Calibrador D Baixo, pronto a usar (*frasco com a tampa amarela*).
ou Para uma **determinação semiquantitativa**, use os Calibradores A a D, prontos a usar, como descrito no esquema das amostras abaixo.



- Passo 4** Prepare uma diluição a **1:201** das amostras do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **1,0 ml** de Diluente do Soro.
- Passo 5** Retire os micropoços necessários do pacote e guarde as tiras não utilizadas no pacote fechado dentro do frigorífico. Coloque correctamente as micropoços no suporte extra fornecido.
- Passo 6** Deite com uma pipeta **100 µl** de Calibradores, prontos a usar, Controlos Positivo e Negativo e amostras dos doentes diluídas nas respectivas micropoços como indicado na folha de protocolo.
Nota: Inclua um poço que contenha **100 µl** de Diluente de Soro como branco de reagente. Determine o zero do leitor ELISA em relação ao branco de reagente.
- Passo 7** Incube **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 8** Lave **4x** com tampão de lavagem. Em caso de lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido invertendo e sacudindo o conteúdo de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para enxugar após a última lavagem, inverta as tiras e sacuda vigorosamente em toalhetes de papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.
- Passo 9** Deite com uma pipeta **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- Passo 10** Incube **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 11** Lave todos os micropoços como indicado no Passo 8.
- Passo 12** Deite com uma pipeta **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempos usados para o Conjugado.

PT

Passo 13 Incube **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.

Passo 14 Deite com uma pipeta **100 μ l** de Solução de Paragem em cada micropoço, na mesma ordem e tempos usados para a junção do Substrato Enzimático. Leia os valores da absorvância no prazo de 1 hora após ter juntado a Solução de Bloqueio.

Passo 15 Leia a absorvância de cada micropoço a **405 nm** usando um leitor de microplacas de comprimento de onda simples ou duplo a 405/630 nm em relação ao branco de reagente definido em absorvância zero.

Controlo de Qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o branco de reagente devem ser executados em cada teste para verificar a integridade e a precisão desse teste. A leitura da absorvância do branco de reagente deve ser $< 0,3$. O Calibrador A deve ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário deve-se repetir o teste. O controlo negativo deve ser < 20 UE/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, deve-se calcular a média das duas leituras para determinar as UE/ml. Quando se efectuam as determinações qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Nas determinações semiquantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado no frasco.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras dos doentes podem ser determinadas por ambos os métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

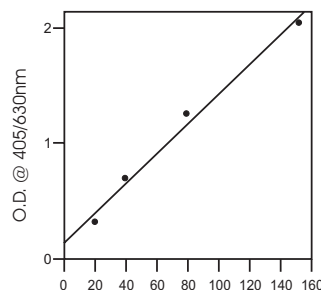
Abs. da Amostra de Teste

$$\text{-----} \times \text{UE/ml do Calibrador D} = \text{UE/ml da Amostra de Teste}$$

Abs. do Calibrador D

2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Registe as absorvâncias do Calibrador A ao D em relação às respectivas concentrações num papel milimétrico linear. Registe a concentração em UE/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e trace a curva mais lógica. Determine as concentrações das amostras dos doentes pela curva em relação ao seu valor de absorvância correspondente.



Calibrador

Os Calibradores prontos a usar são incluídos para determinar a semiquantificação e devem ser usados em cada teste. As amostras dos doentes que contêm níveis de anticorpos mais elevados podem dar valores de absorvância mais elevados do que os do Calibrador A. Para determinar valores semiquantitativos com precisão, essas amostras de soro devem ser mais diluídas de modo que entrem dentro do intervalo da curva do calibrador quando são novamente testadas. Para determinar as UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

Interpretação

O seguinte serve apenas como guia para a interpretação dos resultados de laboratório. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais. Estes podem variar em função da população examinada.

PT

Valor anti-GBM	Interpretação
< 20 UE/ml	Negativo
20-25 UE/ml	Indeterminado (Limiar)
> 25 UE/ml	Positivo

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Os resultados obtidos servem apenas como auxílio para o diagnóstico de nefrite média com anticorpos GBM e *Síndrome de Goodpasture* e não devem ser interpretados como diagnóstico definitivo. Os soros de muitos doentes com RPGN podem ser negativos a anticorpos anti-GBM.

VALORES PREVISTOS

Prevalência de Anticorpos anti-GBM em diferentes grupos de doenças

Doença	N.	Negativo	Positivo	% Positivos
Normais	120	120	0	0
Nefrite Anti-GBM	65	1	64	98,4
Vasculite Sistêmica	40	38	1	2,5
Lúpus Eritematoso Sistêmico	40	40	0	0
Artrite Reumatóide ou Esclerodermia	40	39	1	2,5

REFERENCES BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ LITERATUR BIBLIOGRAP• IE BIBLIOGRAFIA

1. Jayne DRW, Marshall PD, Jones SJ and Lockwood CM. Autoantibodies to GBM and neutrophil cytoplasm in rapidly progressive glomerulonephritis. *Kidney Int*; 1990, 37:965-970.
2. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J. Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med*. 1995. 238:143-152.
3. Wieslander J, Bygren P, Heineg rd D. Anti-basement membrane antibody: Immunoenzymatic assay and specificity of antibodies. *Scand J Clin Lab Invest*. 1981. 41:763-772.
4. Butkowski R, Langeveld J, Wieslander J, Hamilton J, Hudson BG. Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen. *J Biol Chem*, 1987; 262:7874-7877.
5. Hellmark T, Johansson C, Wieslander J. Characterization of anti-GBM antibodies involved in Goodpasture's Syndrome. *Kidney Int*. 1994. 46:823-829.
6. Segelmark M, Butkowski R, Wieslander J. Antigen restriction and IgG subclasses among anti-GBM autoantibodies. *Nephrol Dial Transplant*. 1990. 5:991-996.
7. Wieslander J, Bygren P, Heineg rd D. Isolation of the specific glomerular basement membrane antigen involved in Goodpasture Syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984. 81:1544-1548.
8. Wieslander J, Barr JF, Butkowski RJ, Edwards SJ, Bygren P, Heineg rd D, and Hudson BG. Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: localization to noncollagenous regions of type IV collagen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 81:3838-3842.
9. Hudson BG, Wieslander J, Wisdom B, Noelken ME. Biology of disease. Goodpasture Syndrome: Molecular architecture and function of the basement membrane antigen. *Lab Invest*. 1989. 61:256-269.
10. Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K. Type IV collagen: Structure, gene organization, and role in human disease. *J Biol Chem*. 1993. 268:26033-26036.
11. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EU Authorized Re-representative/Autorisierter Re-räsentant/Ra—resentante
Autorizzato/Re-resentante Autorizado/Re-résentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

www.emergogroup.com