



Anti-Glomerular Basement Membrane (GBM) Test System

IVD

PRODUCT INSERT

REF 1124 Anti-GBM (Primate Kidney) 48 Determinations

INTENDED USE

An indirect immunofluorescence (IFA) antibody test for the detection and semi-quantitation of anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

Rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) is a clinical syndrome developing over days or weeks characterized by crescentic glomerulonephritis as seen by histopathology of the kidney. The prognosis is poor if not recognized early and if an appropriate treatment is not instituted. RPGN may be assessed based on indirect immunofluorescence serum studies and electron microscope evaluations of renal biopsies.

Using the above criteria RPGN may be classified into:

- Immune complex mediated disease characterized by the presence of anti-DNA antibodies or anti-streptococcal antibodies.
- Anti-glomerular basement membrane (GBM) mediated glomerulonephritis and Goodpasture's syndrome.
- 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. 2% had both ANCA and anti-GBM antibodies. The frequency of anti-GBM antibodies and associated diseases are listed in Table 1.

PRINCIPLES OF PROCEDURES

In this IFA method, to enhance the specific fluorescence staining, the tissue substrate is first incubated with an Antigen Enhancing Buffer prior to the incubation with patient sera. Patients' sera are incubated on monkey kidney substrate to allow binding of antibodies to the substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled, anti-human IgG conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters.

The presence of anti-GBM antibody reactions are demonstrated by an apple green fluorescence of the basement membrane of the kidney glomeruli. The titer (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) is then determined by testing serial dilutions.

PRODUCT INFORMATION

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.

Materials Provided

ImmuGlo™ Anti-GBM (Primate Kidney) REF 1124

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

8 x

SORB	SLD	6
------	-----	---

6 well **Monkey Kidney Substrate Slides**

1 x 0.5 ml

CONTROL	+	GBM
---------	---	-----

*

GBM Positive Control. Human serum containing GBM antibodies.






EN

1 x 0.5 ml	CONTROL - GBM *	GBM Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Anti-human FITC Conjugate. Protect from light.
1 x 5.0 ml	IgG-CONJ FITC EB *†	Anti-human IgG FITC Conjugate containing Evan's Blue. Protect from light.
1 x 5.0 ml	DIL-ENH GBM	Antigen enhancing buffer.
1 x 60 ml	BUF GBM *	GBM sample diluent.
2 x	BUF WASH	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Mounting Medium. Do not freeze.
1 x 1.0 ml	EVANS	Evan's Blue Counterstain
1 x 12	COVER SLD	Coverslips.

* Contains < 0.1% NaN₃

† Replaces conjugate without counterstain in Code numbers containing EB

Symbols used on labels:

LOT	Lot number
REF	Catalog number
	Use by
	Storage temperature
	Read instructions for use
IVD	In vitro diagnostic use
	Manufacturer
	Number of Tests

Materials Required But Not Provided

- Fluorescence microscope
- Micropipette or Pasteur pipette
- Serological pipettes
- Staining dish (e.g. Coplin jar)
- Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack
- Distilled or deionized water
- 1 liter container
- Wash bottle
- Paper towels
- Incubation chamber

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. 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. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials².

WARNING - Sodium azide (NaN₃) 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 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. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

1. Dilute each patient serum **1:10** with the Buffered Diluent provided (0.1 ml serum + 0.9 ml Diluent). **Do not** dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for **10-15 minutes**. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Pipet **1 to 2 drops of Antigen Enhancing Buffer** onto each well. Place the lid on the incubation chamber and incubate **30 minutes** at room temperature.
5. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10 ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides.
6. Remove slide from Coplin jar and shake off excess liquid and place the slide in the incubation chamber. Gently place blotter onto slide and press.
7. Invert dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50 µl) of the **Negative Control** to well #1. Similarly apply **1 drop of Positive Control** to well #2. Avoid overfilling the wells.
8. Using a micropipette or Pasteur pipette, apply **1 drop** of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
9. Place the lid on the incubation chamber and incubate **30 minutes** at room temperature.
10. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10 ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides.
11. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the **Conjugate** dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50 µl) to each well. Repeat process with all remaining slides.
12. Replace the lid on the incubation chamber and incubate **30 minutes** at room temperature.

13. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10 ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides. **NOTE:** Improper washing may lead to increased background fluorescence.
14. Remove a slide from the Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **While slide is still wet mount the coverslip.** Place **3 drops** of the Mounting Medium evenly spaced on a coverslip and invert the slide onto the coverslip. To remove any air bubbles gently apply pressure along the edge of the coverslip. Avoid any movement of the coverslip. Repeat process with all remaining slides
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of **200x** or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.

B: End Point Determination (Titration)

A serial two-fold dilutions starting at 1:10 (see below). Using one slide, a serum may be tested at dilutions ranging from 1:10 to 1:320. If positive at a 1:320 dilution, the titer is reported as greater or equal to 320. Additional slides may be used to obtain endpoints for those sera still positive at a 1:320 dilution. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

Preparation of Serial Dilutions

Number six tubes 1 through 6. Add 0.9 ml of Buffered Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 6. Pipette 0.1 ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2 ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2 ml from one tube to the next after mixing to yield the dilutions depicted in the following table:

Tubes	1	2	3	4	5	6
Serum	0.1 ml					
	+					
Buffered Diluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↗	↗	↗	↗	↗
Transfer		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Final dilution	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

QUALITY CONTROL

Both Positive and Negative Controls should be included with each test run. The negative control should show no specific fluorescence of the kidney glomeruli, whereas the positive control should have 2+ or greater staining intensity of the basement membrane of the kidney glomeruli.

If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control.
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope. These may include: improper alignment, use of the bulb beyond useful life expectancy, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.

RESULTS

The results of the tests for anti-GBM should be reported as negative (<10), positive greater or equal to 320, or preferably, positive with titer. Read for specific linear basement membrane staining of the kidney glomeruli. See photo 1 at the end of this document.

EN

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

In some cases, sera positive for anti-GBM antibodies may either be very weak or negative at the initial screening dilution (prozone phenomenon). In such doubtful cases the sera should be screened at higher dilutions and, if positive, antibody titers determined.

In some cases the presence of two or more antibodies in a serum which are reactive with the same substrate may cause an interference in their detection by immunofluorescence. This interference may cause either a failure to detect anti-GBM antibodies or a suppression of the titer if the interfering antibody has a higher titer than anti-GBM antibodies.

EXPECTED VALUES

Anti-GBM antibodies react with the glomerular basement membrane, the tubular basement membrane or the alveolar basement membrane with a continuous and linear pattern³. The anti-GBM antibodies are primarily of the IgG class. Approximately 5% of the patients with rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) are anti-GBM antibody positive¹. Goodpasture's Syndrome (glomerulonephritis and pulmonary hemorrhage) accounts for two thirds of the patients positive for anti-GBM antibodies. RPGN and milder forms of glomerulonephritis account for the other one third. Occasionally, patients with anti-GBM antibodies may have only lung involvement⁴.

Anti-GBM antibodies are associated with Goodpasture's syndrome and RPGN. Circulating anti-GBM antibodies are present in 90% of patients with Goodpasture's syndrome and 60% of patients with RPGN. These antibodies may disappear 4-8 months after bilateral nephrectomy⁵.



Σύστημα ανάλυσης αντισωμάτων κατά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1124 Αντι-ΣΒΜ (νεφρός πρωτευνόντων) 48 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια ανάλυση αντισωμάτων έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFA) για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων κατά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ) σε ορό ανθρώπου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα (ΤΕΣΝ) είναι ένα κλινικό σύνδρομο που αναπτύσσεται εντός ημερών ή εβδομάδων και χαρακτηρίζεται από εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα, όπως φαίνεται στην ιστοπαθολογία του νεφρού. Εάν δεν αναγνωριστεί έγκαιρα και δεν εφαρμοστεί η κατάλληλη θεραπεία, η πρόγνωση είναι κακή. Η ΤΕΣΝ μπορεί να αξιολογηθεί με βάση μελέτες έμμεσου ανοσοφθορισμού στον ορό και αξιολογήσεις νεφρικών βιοψιών με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω κριτήρια, η ΤΕΣΝ μπορεί να ταξινομηθεί σε:

- νόσο στην οποία διαμεσολαβούν ανοσοσύμπλοκα και η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντισωμάτων κατά του DNA ή κατά του στρεπτόκοκκου.
- σπειραματονεφρίτιδα στην οποία διαμεσολαβούν αντισώματα κατά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ) και σύνδρομο Goodpasture.
- σπειραματονεφρίτιδα σχετιζόμενη με αντισώματα κατά του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων (ANCA).

Σε μια μελέτη από τους Jayne et al¹, από 889 ασθενείς με υποψία ΤΕΣΝ, 47 (5%) εμφάνισαν αντι-ΣΒΜ 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-ΣΒΜ αντισώματα. Η συχνότητα των αντισωμάτων αντι-GBM και οι ασθένειες παρατίθεται στον πίνακα 1.

ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Σε αυτή τη μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού, προκειμένου να ενισχυθεί η ειδική χρώση φθορισμού, το ιστικό υπόστρωμα επωάζεται πρώτα με ένα ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης αντιγόνου προτού επωαστεί με τους ορούς των ασθενών. Οι οροί των ασθενών επωάζονται σε υπόστρωμα νεφρού πιθήκου, προκειμένου να επιτευχθεί η δέσμευση των αντισωμάτων στο υπόστρωμα. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύονται αφαιρούνται με έκπλυση. Τα αντισώματα τάξης IgG που έχουν δεσμευθεί ανιχνεύονται με την επώαση του υποστρώματος με συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης IgG, το οποίο είναι σημασμένο με φλουοροσκεΐνη. Οι αντιδράσεις παρακολουθούνται με μικροσκόπιο φθορισμού που διαθέτει τα κατάλληλα φίλτρα. Η παρουσία των αντιδράσεων των αντισωμάτων αντι-ΣΒΜ διαπιστώνεται με την παρουσία φθορισμού έντονου πράσινου χρώματος στη βασική μεμβράνη των νεφρικών σπειραμάτων.

Στη συνέχεια, καθορίζεται ο τίτλος (το αντίστροφο της υψηλότερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση) με ανάλυση διαδοχικών αραιώσεων.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια φυλάσσονται στους 2-8°C. Τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση, εφόσον φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

EL

Υλικά που παρέχονται

Αντι-ΣΒΜ (νεφρός πρωτευνόντων) ImmuGlo™ **REF** 1124

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 48 προσδιορισμών

8 x	SORB SLD 6	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος νεφρού πιθήκου με 6 κυψελίδες
1 x 0,5 ml	CONTROL + GBM *	Διάλυμα θετικού ελέγχου ΣΒΜ. Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της ΣΒΜ.
1 x 0,5 ml	CONTROL - GBM *	Διάλυμα αρνητικού ελέγχου ΣΒΜ. Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης IgG συζευγμένο με FITC. Να προστατεύεται από το φως.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB * †	Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG με χρωστική Evans Blue. Να προστατεύεται από το φως.
1 x 5 ml	DIL-ENH GBM	Ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης αντιγόνου.
1 x 60 ml	BUF GBM *	Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων ΣΒΜ.
2 x	BUF WASH	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Διαλύστε κάθε φιαλίδιο έως όγκο 1 λίτρου.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Μέσο. Να μην καταψύχεται.
1 x 1,0 ml	EVANS	Επίχρωση Evans blue.
1 x 12	COVER SLD	Καλυπτρίδες.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃

† Αντικαθιστά συζευκτικό χωρίς σαφρανίνης στον κώδικα αριθμούς περιέχουν EB

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

- Μικροσκόπιο φθορισμού
- Μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur

EL

- Ορολογικές πιπέτες
- Τρυβλίο χρώσης (π.χ. δοχείο Corlin)
- Μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 13 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Δοχείο ενός λίτρου
- Φιάλη έκπλυσης
- Απορροφητικά χαρτιά
- Θάλαμος επώασης

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. 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). Όλα τα δείγματα ανθρώπινου ορού και προϊόντων ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών².

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. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση αυτής της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2 - 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, ο ορός θα πρέπει να καταψυχθεί στους - 20°C. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μέθοδος ανάλυσης

A. Διαλογή

1. Αραιώστε τον ορό κάθε ασθενούς σε αναλογία **1:10** με το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης που παρέχεται (0,1 ml ορού + 0,9 ml διάλυμα αραιώσης). **Μην** αραιώνετε τα διαλύματα θετικού ή αρνητικού ελέγχου. Φυλάξτε τους μη αραιωμένους ορούς για να καθορίσετε τους τίτλους αντισωμάτων, εάν οι αναλύσεις διαλογής βρεθούν θετικές.
2. Αφήστε τις θήκες που περιέχουν τις αντικειμενοφόρους του υποστρώματος επί **10-15 λεπτά**, προκειμένου να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρέστε προσεκτικά τις αντικειμενοφόρους χωρίς να αγγίξετε το υπόστρωμα.
3. Σημάνετε τις αντικειμενοφόρους και τοποθετήστε τις σε ένα θάλαμο επώασης που έχετε καλύψει με απορροφητικό χαρτί διαβρεγμένο με νερό, για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση.

4. Προσθέστε με πιπέτα **1 ή 2 σταγόνες ρυθμιστικού διαλύματος ενίσχυσης αντιγόνου** σε κάθε κυψελίδα. Τοποθετήστε το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επωάστε τις αντικειμενοφόρους επί **30 λεπτά** σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εκπλύνετε με περίπου **10 ml** PBS χρησιμοποιώντας μια πιπέτα ή εκπλύνετε την αντικειμενοφόρο σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει PBS. Μη χρησιμοποιείτε φιάλη έκπλυσης. Μεταφέρετε την αντικειμενοφόρο αμέσως στο δοχείο Corlin και εκπλύνετε επί **10 λεπτά**. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.
6. Αφαιρέστε την αντικειμενοφόρο από το δοχείο Corlin, ανακινήστε την ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια υγρού και τοποθετήστε την στο θάλαμο επώασης. Τοποθετήστε απαλά το συτυπόχαρτο επάνω στην αντικειμενοφόρο και πιέστε.
7. Αναστρέψτε το σταγονόμετρο και πιέστε το ελαφρά για να προσθέσετε **1 σταγόνα** (περίπου 50 μl) του **διαλύματος αρνητικού ελέγχου** στην κυψελίδα υπ' αριθμόν 1. Με τον ίδιο τρόπο, προσθέστε **1 σταγόνα διαλύματος θετικού ελέγχου** στην κυψελίδα υπ' αριθμόν 2. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
8. Χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur, προσθέστε **1 σταγόνα** από τον αραιωμένο ορό του ασθενούς (περίπου 50 μl) στις υπόλοιπες κυψελίδες. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
9. Τοποθετήστε το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επωάστε τις αντικειμενοφόρους επί **30 λεπτά** σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εκπλύνετε με περίπου **10 ml** PBS χρησιμοποιώντας μια πιπέτα ή εκπλύνετε την αντικειμενοφόρο σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει PBS. Μη χρησιμοποιείτε φιάλη έκπλυσης. Μεταφέρετε την αντικειμενοφόρο αμέσως στο δοχείο Corlin και εκπλύνετε επί **10 λεπτά**. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.
11. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο στο θάλαμο επώασης. Αναστρέψτε αμέσως το σταγονόμετρο με το **συζευκτικό αντίσωμα** και πιέστε το μαλακά για να προσθέσετε **1 σταγόνα** (περίπου 50 μl) σε κάθε κυψελίδα. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.
12. Τοποθετήστε το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επωάστε τις αντικειμενοφόρους επί **30 λεπτά** σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εκπλύνετε με περίπου **10 ml** PBS χρησιμοποιώντας μια πιπέτα ή εκπλύνετε την αντικειμενοφόρο σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει PBS. Μη χρησιμοποιείτε φιάλη έκπλυσης. Μεταφέρετε την αντικειμενοφόρο αμέσως στο δοχείο Corlin και εκπλύνετε επί **10 λεπτά**. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τυχόν ακατάλληλη έκπλυση ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένο φθορισμό υποβάθρου.
14. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το δοχείο Corlin. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. **Εφαρμόστε την καλυπτρίδα ενόσω η αντικειμενοφόρος είναι ακόμα υγρή.** Προσθέστε **3 σταγόνες** μέσου ομοιόμορφα σε μια καλυπτρίδα, αναστρέψτε την αντικειμενοφόρο και τοποθετήστε την επάνω στην καλυπτρίδα. Για να απομακρύνετε τυχόν φυσαλίδες αέρα εφαρμόστε πίεση κατά μήκος της άκρης της καλυπτρίδας. Αποφύγετε τυχόν μετατόπιση της καλυπτρίδας. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.
15. Εξετάστε για ειδικό φθορισμό με μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση **200x** ή μεγαλύτερη.

Οι αντικειμενοφόροι μπορούν να διαβαστούν μόλις προετοιμαστούν. Ωστόσο, εξαιτίας της παρουσίας παράγοντα προστασίας φθορισμού στο μέσο καθήλωσης, δεν εμφανίζεται σημαντική απώλεια της έντασης της χρώσης, εάν καθυστερήσει η ανάγνωση έως και 48 ώρες. Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να φυλάσσονται σε σκοτεινό χώρο, σε θερμοκρασία 2-8°C.

B. Προσδιορισμός τελικού σημείου (Τιτλοδότηση)

Ένα ορός που θα βρεθεί θετικός στην ανάλυση διαλογής μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω, ακολουθώντας τα βήματα 4 έως 15 για να καθοριστεί ο τίτλος του. Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τα διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου. Εκτελέστε διαδοχικές διπλές αραιώσεις ξεκινώντας από την αναλογία 1:10 (δείτε παρακάτω). Χρησιμοποιώντας μία αντικειμενοφόρο, ένας ορός μπορεί να αναλυθεί σε αραιώσεις που κυμαίνονται από 1:10 έως 1:320. Εάν είναι θετικός στην αραιώση 1:320, ο τίτλος αναφέρεται ως μεγαλύτερος ή ίσος με 320. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιπλέον αντικειμενοφόροι, προκειμένου να ληφθούν τελικά σημεία για τους ορούς που παραμένουν θετικοί σε αραιώση 1:320. Ο τίτλος είναι το αντίστροφο της μεγαλύτερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση.

Προετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων

Αριθμήστε έξι σωληνάρια από το 1 έως το 6. Προσθέστε 0,9 ml ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης στο σωληνάριο 1 και 0,2 ml στα σωληνάρια 2 έως 6. Μεταφέρετε με πιπέτα 0,1 ml μη αραιωμένου ορού στο σωληνάριο 1 και αναμίξτε επιμελώς. Μεταφέρετε 0,2 ml από το σωληνάριο 1 στο σωληνάριο 2 και αναμίξτε επιμελώς. Συνεχίστε τη μεταφορά 0,2 ml από το ένα σωληνάριο στο επόμενο μετά από ανάμιξη, προκειμένου να επιτύχετε τις αραιώσεις που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Σωληνάριο	1	2	3	4	5	6
Ορός	0,1 ml					
	+					
Αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Μεταφορά	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Τελική αραιώση	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 κλπ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τόσο ένα διάλυμα θετικού όσο και ένα διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου θα πρέπει να μην παρουσιάζει ειδικό φθορισμό των νεφρικών σπειραμάτων, ενώ το διάλυμα θετικού ελέγχου θα πρέπει να παρουσιάζει ένταση φθορισμού της βασικής μεμβράνης των νεφρικών σπειραμάτων ίση με 2+ ή μεγαλύτερη.

Εάν δεν λάβετε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, θα πρέπει να επαναλάβετε την ανάλυση. Εάν συνεχίζουν να εμφανίζονται ανεπαρκή αποτελέσματα με τα διαλύματα ελέγχου, αυτά ενδέχεται να οφείλονται σε:

- Θολρότητα. Απορρίψτε το διάλυμα ελέγχου και χρησιμοποιήστε ένα άλλο.
- Προβλήματα με το οπτικό σύστημα του μικροσκοπίου φθορισμού. Σε αυτά μπορεί να περιλαμβάνονται: ακατάλληλη ευθυγράμμιση, παρέλευση της ωφέλιμης διάρκειας ζωής της λυχνίας, κλπ.
- Αποξήρανση της αντικειμενοφόρου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για αντισώματα κατά της ΣΒΜ θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά (<10), θετικά μεγαλύτερα ή ίσα με 320 ή, κατά προτίμηση, θετικά με τίτλο.

Εξετάστε για ειδική γραμμική χρώση της βασικής μεμβράνης στα νεφρικά σπειράματα. Βλ. τη φωτογραφία 1 στο τέλος αυτού του εντύπου.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οροί θετικοί για τα αντισώματα αντι-ΣΒΜ ενδέχεται να εμφανιστούν πολύ ασθενείς ή αρνητικοί στην αρχική αραιώση διαλογής (φαινόμενο προζώνης). Σε τέτοιες αμφίβολες περιπτώσεις, οι οροί θα πρέπει να εξετάζονται σε υψηλότερες αραιώσεις, και εάν βρεθούν θετικοί, να καθορίζονται οι τίτλοι των αντισωμάτων.

EL

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η παρουσία δύο ή περισσότερων αντισωμάτων σε έναν ορό, τα οποία αντιδρούν με το ίδιο υπόστρωμα, ενδέχεται να επηρεάζει την ανίχνευσή τους με ανοσοφθορισμό. Αυτή η επίδραση ενδέχεται να προκαλέσει είτε αδυναμία ανίχνευσης αντισωμάτων αντι-ΣΒΜ είτε μείωση του τίτλου εάν το αντίσωμα που επιδρά έχει μεγαλύτερο τίτλο από τα αντισώματα αντι-ΣΒΜ.

ANAMENOMENES TIMEΣ

Τα αντισώματα κατά της ΣΒΜ αντιδρούν με τη σπειραματική βασική μεμβράνη, με τη βασική μεμβράνη των σωληναρίων ή με την κυψελιδική βασική μεμβράνη, με ένα συνεχές και γραμμικό πρότυπο³. Τα αντισώματα κατά της ΣΒΜ είναι κυρίως της τάξης IgG. Περίπου το 5% των ασθενών με ταχέως εξελισσόμενη σπειραματονεφρίτιδα (ΤΕΣΝ) είναι θετικοί για αντισώματα κατά της ΣΒΜ¹. Τα δύο τρίτα των ασθενών που είναι θετικοί για τα αντισώματα κατά της ΣΒΜ πάσχουν από σύνδρομο Goodpasture (σπειραματονεφρίτιδα και πνευμονική αιμορραγία). Το υπόλοιπο ένα τρίτο πάσχει από ΤΕΣΝ και από ηπιότερες μορφές σπειραματονεφρίτιδας. Περιστασιακά, σε ασθενείς με αντισώματα κατά της ΣΒΜ ενδέχεται να εμπλέκονται μόνο οι πνεύμονες⁴.

Τα αντισώματα κατά της ΣΒΜ σχετίζονται με το σύνδρομο Goodpasture και με την ΤΕΣΝ. Αντισώματα κατά της ΣΒΜ βρίσκονται στην κυκλοφορία του 90% των ασθενών με σύνδρομο Goodpasture και του 60% των ασθενών με ΤΕΣΝ. Τα αντισώματα αυτά ενδέχεται να εξαλειφθούν 4-8 μήνες έπειτα από αμφοτερόπλευρη νεφρεκτομή⁵.

ES



Sistema de detección de anticuerpos anti-membrana basal glomerular (MBG)

IVD

PROSPECTO

REF 1124 Anti-MBG (riñón de mono) 48 análisis

USO PREVISTO

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IF) para la detección y cuantificación de anticuerpos anti-membrana basal glomerular (MBG) en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP) es un síndrome clínico que evoluciona en días o semanas, caracterizado por glomerulonefritis crescéntica como evidencia la histopatología del riñón. La prognosis no es alentadora si no hay un reconocimiento temprano de la enfermedad con consiguiente tratamiento. LA GNRP puede diagnosticarse mediante estudios de inmunofluorescencia indirecta efectuados en el suero y estudiando biopsias renales mediante microscopio electrónico.

Siguiendo los criterios antedichos, la GNRP puede clasificarse en:

- Enfermedad de complejos inmunes caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-ADN o anti-estreptocócicos.
- Glomerulonefritis anti-membrana basal glomerular (MBG) y síndrome de Goodpasture.
- Glomerulonefritis asociada a anticuerpos anti-neutrófilo citoplasmático (ANCA).

Según un estudio de Jayne et al ¹ 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. La frecuencia de anticuerpos anti-GBM y las enfermedades asociadas se enumeran en el cuadro 1.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

En la técnica IF indirecta utilizada en este kit, con la finalidad de aumentar la coloración fluorescente específica, el tejido substrato se incuba con un tampón intensificador de antígeno antes de incubarlo con el suero del paciente. Los sueros de paciente se incuban en un substrato de riñón de mono para la unión de los anticuerpos al substrato. Los anticuerpos que no hayan reaccionado se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos de clase IgG se detectan incubando el substrato con conjugado de IgG antihumana marcada con fluoresceína. La reacción se observa en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. La presencia de anticuerpos anti-MBG es revelada por una fluorescencia de color verde manzana en la membrana basal de los glomérulos del riñón. El título (el recíproco de la mayor dilución que provocó una reacción positiva) se determina analizando las diluciones seriadas.

DATOS DEL PRODUCTO

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. Los reactivos están listos para su uso tan pronto como alcanzan la temperatura ambiente.

Material suministrado

Anti-MBG (riñón de mono) ImmuGlo™ REF 1124

El kit contiene reactivos suficientes para efectuar 48 análisis.

8 x

SORB	SLD	6
------	-----	---

Portas de **substrato de riñón de mono**, 6 pocillos.






ES

1 x 0,5 ml	CONTROL + GBM *	Control positivo para MBG. Contiene suero humano con anticuerpos MBG.
1 x 0,5 ml	CONTROL - GBM *	Control negativo para MBG. Contiene suero humano.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Conjugado de IgG antihumana con FITC. Protéjase de la luz.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB *†	Conjugado de IgG antihumana FITC con azul de Evans. Protéjase de la luz.
1 x 5 ml	DIL-ENH GBM	Tampón intensificador de antígeno.
1 x 60 ml	BUF GBM *	Diluyente de muestra MBG.
2 x	BUF WASH	Tampón fosfato salino (PBS). Disolver cada vial hasta 1 litro.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Medio de montaje. No congelar.
1 x 1,0 ml	EVANS	Contraste azul de Evans
1 x 12	COVER SLD	Cubreobjetos.

* Contiene < 0.1% NaN₃

† Substituye la conjugación sin counterstain en los números de código que contienen el EB

Símbolos empleados en las etiquetas:

REF	Número de catálogo
	Fecha de caducidad
	Temperatura de conservación
	Léanse las instrucciones de uso
IVD	Para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fabricante
	Número de análisis

Material necesario no incluido

- Microscopio de fluorescencia
- Micropipetas o pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas
- Cubeta de tinción (p.ej. cubeta de Coplin)
- Tubos de ensayo pequeños (p.e. 13 x 75 mm) y gradilla para tubos
- Agua destilada o desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco lavador
- Toallas de papel
- Cámara de incubación

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo material de origen humano usado en la preparación de este producto se ha examinado con métodos aprobados por la FDA, y resultó negativo a anticuerpos contra HIV, HbsAg y HCV. Las muestras de suero humano y los productos de origen humana deben considerarse potencialmente peligrosos independientemente de su origen. Respétense las buenas prácticas de laboratorio al conservar, dispensar y eliminar tales materiales².

ATENCIÓN: la azida de sodio (NaN_3) puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías y formar azidas metálicas altamente explosivas. Después de dispensar líquidos, se recomienda lavar con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas. La azida de sodio puede ser tóxica por ingestión; en caso de ingestión accidental, informe inmediatamente del hecho al director del laboratorio o a un centro de control de envenenamientos.

Siga estrictamente las instrucciones tal como se presentan en este prospecto para garantizar resultados válidos. No cambie los componentes del kit con otros de otras fuentes o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. No los utilice después de la fecha de caducidad.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Este procedimiento requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas con microbios. Conserve las muestras a 2-8°C por no más de una semana. Para una conservación más prolongada, congele el suero a -20°C. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Metodología del análisis

A. Control

1. Diluya el suero del paciente en proporción **1:10** con el diluyente tamponado (0,1 ml de suero + 0,9 ml de diluyente). **No** diluya los controles positivo o negativo. Conserve el suero no diluido para determinar la titulación de anticuerpos si los análisis resultaran positivos.
2. Espere a que las bolsas con los portas de substrato se estabilicen a la temperatura ambiente durante **10-15 minutos**. Extraiga los portas cuidadosamente sin tocar el substrato.
3. Etiquete los portas y colóquelos en la cámara de incubación acondicionada con toallas de papel humedecidas para mantener las condiciones de humedad adecuadas.
4. Pipetee **1 ó 2** gotas de **tampón intensificador de antígeno** en cada pocillo. Ponga en la cámara de incubación e incube durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
5. Retire un porta de la cámara de incubación. Sosteniéndolo por un extremo, lávelo delicadamente con una pipeta y aproximadamente **10 ml** de PBS, o bien en un recipiente lleno de PBS. No utilice frasco de lavado. Transfiera de inmediato el porta a una cubeta de Coplin y lávelo durante **10 minutos**. Repita el procedimiento con los restantes portas
6. Retire el porta de la cubeta de Coplin, elimine el exceso de líquido y ponga el porta en la cámara de incubación. Ponga suavemente papel absorbente sobre el porta y presione.
7. Con el frasco gotero del **control negativo**, aplique delicadamente **una gota** (aproximadamente 50 μl) en el pocillo #1; del mismo modo, aplique **1 gota de control positivo** en el pocillo #2. No llene demasiado los pocillos.
8. Con una micropipeta o pipeta Pasteur, ponga **1 gota** de suero diluido del paciente (aproximadamente 50 μl) en los restantes pocillos. No los llene demasiado.
9. Coloque la tapa en la cámara de incubación. Incube **30 minutos** a temperatura ambiente.
10. Retire un porta de la cámara de incubación. Sosteniéndolo por un extremo, lávelo delicadamente con una pipeta y aproximadamente **10 ml** de PBS, o bien en un recipiente lleno de PBS. No utilice frasco de lavado. Transfiera de inmediato el porta a una cubeta de Coplin y lávelo durante **10 minutos**. Repita el procedimiento con los restantes portas.

11. Seque el borde de los portas con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Ponga los portas en la cámara de incubación. Acto seguido, con el frasco gotero de **conjugado** aplique **1 gota** (aproximadamente 50 µl) en cada pocillo. Repita el procedimiento con los restantes portas.
12. Coloque la tapa en la cámara de incubación. Incube 30 minutos a temperatura ambiente.
13. Extraiga un porta del incubador. Sosteniéndolo por un extremo, lávelo delicadamente con una pipeta y aproximadamente **10 ml** de PBS, o bien sumérjalo en un recipiente con PBS. No utilice frasco de lavado. Ponga de inmediato los portas en una cubeta de Coplin y lávelos durante 10 minutos. Repita el procedimiento con los restantes portas. **NOTA:** un lavado inadecuado podría aumentar la fluorescencia de fondo.
14. Retire un porta de la cubeta de Coplin. Seque el borde con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. **Monte el cubreobjetos mientras el porta todavía está húmedo.** Aplique uniformemente en el cubre **3 gotas** de medio de montaje; invierta el porta sobre el cubre. Elimine posibles burbujas de aire presionando suavemente a lo largo del borde del cubre, evitando que éste se mueva. Haga lo mismo con el resto de los portas.
15. Examine la fluorescencia específica con microscopio de fluorescencia con aumento de **200x** o más.

Los portas se han de leer tan pronto como estén listos. Sin embargo, gracias a la presencia de un agente antidecoloración en el medio de montaje, no se produce una disminución significativa en la intensidad de coloración aunque la lectura se postergue por 48 horas. Los portas deben conservarse en la oscuridad a una temperatura entre 2 y 8°C.

B. Determinación de punto final (titulación)

Una dilución seriada por duplicado a partir de 1:10 (ver más abajo). Utilizando un porta, se analiza un suero en diluciones que van de 1:10 a 1:320. Si resulta positivo a la dilución de 1:320, el título se registra como igual o superior a 320. Pueden utilizarse portas adicionales para obtener puntos finales de los sueros que siguen siendo positivos a la dilución de 1:320. El recíproco de la mayor dilución que provoca una reacción positiva es la titulación.

Preparación de diluciones seriadas

Numere seis tubos de 1 a 6. Ponga 0,9 ml de diluyente tamponado en el tubo número 1 y 0,2 ml en los tubos de 2 a 6. Pipetee 0,1 ml de suero sin diluir en el tubo 1 y mezcle bien. Transfiera 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezcle bien. Siga transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente después de mezclar hasta producir las diluciones indicadas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4	5	6
Suero	0,1 ml					
	+					
Diluyente tamponado	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		⇌	⇌	⇌	⇌	⇌
Transferir		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilución final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

CONTROL DE CALIDAD

En cada ciclo de análisis se deben incluir un control positivo y un control negativo. El control negativo no debe evidenciar una fluorescencia específica de los glomérulos del riñón, mientras que el control positivo debe tener una intensidad de coloración de la membrana basal de los glomérulos del riñón equivalente a 2+ o superior.

Si no se obtienen los resultados esperados, hay que repetir el análisis. Si se siguen obteniendo resultados inadecuados con los controles, puede deberse a:

- Turbidez. Descarte el control y utilice otro.
- Problemas en el sistema óptico del microscopio de fluorescencia tales como alineación incorrecta, lámpara que debe ser cambiada, etc.
- El porta se secó durante el proceso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de los análisis de anticuerpos anti-MBG deben considerarse negativos (< 10), positivos (superior o igual a 320) o, preferiblemente, positivos con título.

Lea la coloración lineal específica de la membrana basal de los glomérulos del riñón. Véase la foto 1 al final de este documento.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunos casos, un suero positivo a anticuerpos anti-MBG puede resultar muy débil o negativo en el control inicial de dilución (fenómeno prozona). En estos casos dudosos, el suero debe ser sometido a control en diluciones más altas; si resultara positivo, se determinarán los títulos del anticuerpo.

En algunos casos, la presencia en un suero de dos o más anticuerpos que reaccionan con el mismo sustrato puede provocar interferencias en la detección mediante inmunofluorescencia. Esta interferencia podría impedir la detección de los anticuerpos anti-MBG o la supresión de su título si el anticuerpo interferente tiene un título superior al de los anticuerpos anti-MBG.

VALORES ESPERADOS

Los anticuerpos anti-MBG reaccionan con la membrana basal glomerular, la membrana basal tubular o la membrana basal alveolar con un patrón continuo y lineal³. Los anticuerpos anti-MBG pertenecen fundamentalmente a la clase IgG. Aproximadamente el 5% de los pacientes con glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP) resultan positivos a los anticuerpos anti-MBG¹. El síndrome de Goodpasture (glomerulonefritis y hemorragia pulmonar) es el factor determinante en dos tercios de los pacientes positivos a anticuerpos anti-MBG; en el restante tercio lo son la GNRP y otras formas más atenuadas de glomerulonefritis. Ocasionalmente, pacientes con anticuerpos anti-MBG pueden tener afectados solamente los pulmones.

Los anticuerpos anti-MBG están relacionados con el síndrome de Goodpasture y la GNRP. Anticuerpos anti-MBG circulantes están presentes en el 90% de pacientes con síndrome de Goodpasture y el 60% de pacientes con GNRP. Estos anticuerpos pueden desaparecer entre 4 y 8 meses después de una nefrectomía bilateral⁵.



Anti-glomeruläre-Basalmembran-Antikörper-Testsystem (GBM)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1124 Anti-GBM Niere (Primat) 48 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest (IFA) für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM) in Humanserum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Rapid progressive Glomerulonephritis (RPGN) ist ein klinisches Syndrom, das sich über Tage oder Wochen hin entwickelt und bei einer Histopathologie der Niere durch eine halbmondförmige Glomerulonephritis gekennzeichnet ist. Die Prognose ist schlecht, wenn die Krankheit nicht früh erkannt und eine angemessene Behandlung eingeleitet wird. RPGN auf der Grundlage von direkter Immunfluoreszenz und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Nierenbiopsie beurteilt werden. Unter Verwendung der obigen Kriterien kann RPGN wie folgt klassifiziert werden:

- Immunkomplex-vermittelte Erkrankung, die durch das Vorhandensein von Anti-DNA-Antikörpern oder Anti-Streptokokken-Antikörpern gekennzeichnet ist;
- durch Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM) vermittelte Glomerulonephritis und Goodpasture-Syndrom;
- mit antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (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-Antikörper, 246 (28%) ANCA und 576 (65%) keinen der beiden Antikörper. Bei 2% wurden sowohl ANCA als auch Anti-GBM-Antikörper gefunden. Die Frequenz der Anti-GBM Antikörper und die verbundenen Krankheiten werden in Tabelle 1.

TESTPRINZIPIEN

Um die spezifische Fluoreszenzfärbung zu verstärken, wird bei dieser IFA-Methode das Gewebesubstrat vor der Inkubierung mit dem Patientenserum zunächst mit einem Antigen-verstärkenden Puffer inkubiert. Die Patientenseren werden auf Affenierensubstrat inkubiert, um die Bindung der Antikörper an das Substrat zu ermöglichen. Nicht gebundene Antikörper werden durch Spülen entfernt. Gebundene Antikörper der Klasse IgG werden durch Inkubieren des Substrats mit Fluorescein-markiertem Anti-human-IgG-Konjugat nachgewiesen. Die Reaktionen werden unter einem mit den entsprechenden Filtern versehenen Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Das Vorhandensein von Anti-GBM-Antikörperreaktionen wird durch eine apfelgrüne Fluoreszenz der Basalmembran der Nierenglomeruli angezeigt. Der Titer (der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die zu einer positiven Reaktion führt) wird anschließend durch das Testen von Verdünnungsreihen bestimmt.

INFORMATION

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie Raumtemperatur erreicht haben.

Mitgelieferte Materialien

ImmuGlo™ Anti-GBM Niere (Primat) REF 1124

Die Kits enthalten genügend Reagenzien, um je 48 Bestimmungen durchzuführen

DE

8 x	SORB SLD 6	Affennierensubstrat-Objekträger mit 6 Vertiefungen
1 x 0,5 ml	CONTROL + GBM *	GBM-positives Kontrollserum. Humanserum mit GBM-Antikörpern.
1 x 0,5 ml	CONTROL - GBM *	GBM negatives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Anti-human-IgG-FITC-Konjugat. Vor Licht schützen.
1 x 5,0 ml	IgG-CONJ FITC EB *†	Anti-human-IgG-FITC-Konjugat mit Evans-Blau. Vor Licht schützen.
1 x 5,0 ml	DIL-ENH GBM	Antigen-verstärkender Puffer.
1 x 60 ml	BUF GBM *	GBM-Probenverdünner.
2 x	BUF WASH	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Jedes Fläschchen auf 1 Liter auffüllen.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Eindeckmittel. Nicht einfrieren.
1 x 1,0 ml	EVANS	Evans-Blau-Gegenfärbung.
1 x 12	COVER SLD	Deckgläschen.

* Enthält <0,1% NaN₃

† Ersetzt Paronym ohne counterstain in den Kennziffern, die EB enthalten

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

- Fluoreszenzmikroskop
- Mikropipette oder Pasteurpipette
- Serologische Pipetten
- Färbekasten (z.B. Coplin-Färbetrog)
- Kleine Probenröhrchen (z.B. 13 x 75 mm) und Röhrchenhalter
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser

DE

- 1-Liter-Behälter
- Waschflasche
- Papiertücher
- Inkubationskammer

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum. 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. Alle menschlichen Serumproben und Produkte menschlichen Ursprungs sollten unabhängig von ihrer Herkunft als potentiell gefährlich behandelt werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis².

WARNUNG – Natriumazid (NaN_3) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung 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 dieser Kitbeilage 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. Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische 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 bei -20°C eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Testmethode

A. Suchtest

1. Verdünnen Sie jedes Patientenserum **1:10** mit dem mitgelieferten gepufferten Verdünner (0,1 ml Serum + 0,9 ml Verdünner). Verdünnen Sie nicht die positiven und negativen Kontrollseren. Bewahren Sie die unverdünnten Seren auf, um die Antikörpertiter zu bestimmen, falls Suchtests positiv ausfallen.
2. Lassen Sie die Beutel mit den Substratobjektträgern **10-15 Minuten** lang bei Raumtemperatur liegen. Entfernen Sie vorsichtig die Objektträger, ohne das Substrat zu berühren.
3. Kennzeichnen Sie die Objektträger und legen Sie sie in eine Inkubationskammer, die mit mit Wasser befeuchteten Papiertüchern ausgelegt ist, um das Austrocknen zu verhindern.
4. Pipettieren Sie **1 bis 2 Tropfen Antigen-verstärkenden Puffer** in jede Vertiefung. Verschließen Sie die Inkubationskammer und inkubieren Sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
5. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und spülen Sie ihn vorsichtig mit einer Pipette mit etwa 10 ml PBS ab, oder spülen Sie den Objektträger in einem mit PBS gefüllten Becher. Verwenden Sie keine Waschflaschen. Geben Sie den Objektträger sofort in einen Coplin-Trog und waschen Sie ihn 10 Minuten lang. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit allen anderen Objektträgern.
6. Entfernen Sie den Objektträger aus dem Coplin-Trog, schütteln Sie überschüssige Flüssigkeit ab und legen Sie den Objektträger in die Inkubationskammer. Legen Sie vorsichtig ein Löschblatt auf den Objektträger und drücken Sie es an.

DE

7. Drehen Sie das Tropffläschchen um und drücken Sie es vorsichtig, um **1 Tropfen** (etwa 50 µl) **negatives Kontrollserum** in Vertiefung 1 zu geben. Geben Sie auf gleiche Art **1 Tropfen positives Kontrollserum** in Vertiefung 2. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
8. Verwenden Sie einen Mikropipette oder Pasteurpipette, um jeweils **1 Tropfen** (etwa 50 µl) des verdünnten Patientenserums in die übrigen Vertiefungen zu geben. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
9. Verschließen Sie die Inkubationskammer und inkubieren Sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
10. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und spülen Sie ihn vorsichtig mit einer Pipette mit etwa **10 ml** PBS ab, oder spülen Sie den Objektträger in einem mit PBS gefüllten Becher. Verwenden Sie keine Waschflaschen. Geben Sie den Objektträger sofort in einen Coplin-Trog und waschen Sie ihn **10 Minuten** lang. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit allen anderen Objektträgern.
11. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. Legen Sie den Objektträger in die Inkubationskammer. Drehen Sie sofort das Tropffläschchen mit dem **Konjugat** um und drücken Sie es vorsichtig, um **1 Tropfen** (etwa 50 µl) in jede Vertiefung zu geben. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit allen anderen Objektträgern.
12. Verschließen Sie die Inkubationskammer und inkubieren Sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
13. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und spülen Sie ihn vorsichtig mit einer Pipette mit etwa **10 ml** PBS ab, oder spülen Sie den Objektträger in einem mit PBS gefüllten Becher. Verwenden Sie keine Waschflaschen. Geben Sie den Objektträger sofort in einen Coplin-Trog und waschen Sie ihn **10 Minuten** lang. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit allen anderen Objektträgern.
Anmerkung: Unsachgemäßes Waschen kann zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führen.
14. Entfernen Sie einen Objektträger aus dem Coplin-Trog. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. **Legen Sie das Deckgläschen auf, während der Objektträger noch nass ist.** Geben Sie **3 Tropfen** Eindeckmittel in gleichmäßigen Abständen auf ein Deckgläschen und legen Sie dieses umgedreht auf den Objektträger. Drücken Sie vorsichtig entlang des Rands des Deckgläschens, um Luftblasen zu entfernen. Vermeiden Sie jegliches Bewegen des Deckgläschens. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit allen anderen Objektträgern.
15. Untersuchen Sie die Objektträger auf eine spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200-facher Vergrößerung

Die Objektträger können sofort nach ihrer Vorbereitung abgelesen werden. Da das Eindeckmittel jedoch ein Mittel gegen das Verbleichen enthält, tritt kein signifikanter Verlust der Farbtintensität ein, wenn das Ablesen um bis zu 48 Stunden verzögert wird. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8 °C gelagert werden.

B. Endpunkt-Bestimmung (Titration)

Sie können ein im Suchtest positives Serum weiter testen, indem Sie Schritte 4 bis 15 befolgen, um den Titer zu bestimmen. Bei jedem Testlauf sollten die positiven und negativen Kontrollseren mitverwendet werden. Stellen Sie beginnend mit 1:10 eine verdoppelnde Verdünnungsreihe her (siehe unten). Mit einem Objektträger kann ein Serum mit Verdünnungen von 1:10 bis 1:320 getestet werden. Falls das Ergebnis bei 1:320 positiv ist, wird der Titer als größer oder gleich 320 angegeben. Um Endpunkte für die bei 1:320 positiven Seren zu erhalten, können weitere Objektträger verwendet werden. Der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion hervorruft, entspricht dem Titer.

Vorbereitung der Verdünnungsreihen

Nummerieren Sie sechs Röhrchen von 1 bis 6. Geben Sie 0,9 ml Probenverdünner in Röhrchen 1 und je 0,2 ml in Röhrchen 2 bis 6. Pipettieren Sie 0,1 ml unverdünntes Serum in Röhrchen 1 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie 0,2 ml von Röhrchen 1 in Röhrchen 2 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie nach dem Mischen weiterhin jeweils 0,2 ml von einem Röhrchen ins nächste, um die in der nachfolgenden Tabelle angezeigten Verdünnungen zu erhalten:

DE

Röhrchen	1	2	3	4	5	6
Serum	0,1 ml					
	+					
Gepufferter Verdüner	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↗	↗	↗	↗	↗
Übertragung	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Endverdünnung	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 usw.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl das positive als auch das negative Kontrollserum mitverwendet werden. Das negative Kontrollserum sollte keine spezifische Fluoreszenz der Nierenglomeruli zeigen, während das positive Kontrollserum eine Farbintensität der Basalmembran der Nierenglomeruli von 2+ oder höher aufweisen sollte.

Falls die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten werden, sollte der Testlauf wiederholt werden. Falls mit den Kontrollseren weiterhin unzureichende Ergebnisse erzielt werden, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübung. Verwerfen Sie das Kontrollserum und verwenden Sie ein neues.
- Probleme mit dem optischen System des Fluoreszenzmikroskops. Dazu können zählen: falsche Ausrichtung, die Lampe hat ihre Nutzungsdauer überschritten, usw.
- Der Objektträger ist während des Verfahrens ausgetrocknet.

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Tests auf Anti-GBM-Antikörper sollten als negativ (<10), positiv (größer oder gleich 320) oder alternativ als positiv mit Titer angegeben werden.

Achten Sie auf eine spezifische lineare Färbung der Basalmembran der Nierenglomeruli. Siehe Foto 1 am Ende dieses Dokuments.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

In einigen Fällen können Anti-GBM-Antikörper-positive Seren bei der ersten Suchtestverdünnung entweder sehr schwach oder negativ sein (Prozonenphänomen). In solchen Zweifelsfällen sollten die Seren mit einer höheren Verdünnung getestet werden, und im Fall eines positiven Ergebnisses sollte der Antikörpertiter bestimmt werden.

Das Vorhandensein von zwei oder mehr Antikörpern in einem Serum, die mit demselben Substrat reagieren, kann in einigen Fällen deren Nachweis mittels Immunfluoreszenz beeinträchtigen. Diese Beeinträchtigung kann entweder dazu führen, dass die Anti-GBM-Antikörper nicht nachgewiesen werden, oder dass ihr Titer unterdrückt wird, falls der Titer der interferierenden Antikörper höher als der Titer der Anti-GBM-Antikörper ist.

ERWARTETE WERTE

Anti-GBM-Antikörper reagieren mit der glomerulären Basalmembran, der tubulären Basalmembran oder der alveolären Basalmembran mit einem kontinuierlichen und linearen Muster³. Anti-GBM-Antikörper gehören hauptsächlich der Klasse IgG an. Etwa 5% von Patienten mit rapid progressiver Glomerulonephritis (RPGN) sind Anti-GBM-Antikörper-positiv¹. Bei zwei Dritteln der Anti-GBM-Antikörper-positiven Patienten liegt Goodpasture-Syndrom (Glomerulonephritis und Lungenblutung) vor, beim übrigen Drittel RPGN und schwächere Formen von Glomerulonephritis. Gelegentlich kann bei Patienten mit Anti-GBM-Antikörpern nur die Lunge betroffen sein⁴.

Anti-GBM-Antikörper stehen mit Goodpasture-Syndrom und RPGN in Verbindung. Zirkulierende Anti-GBM-Antikörper liegen bei 90% von Patienten mit Goodpasture-Syndrom und 60% von Patienten mit RPGN vor. Diese Antikörper können 4-6 Monate nach einer beidseitigen Nephrektomie verschwinden⁵.

FR



DETECTION DES ANTICORPS DE LA MEMBRANE BASALE ANTI-GLOMERULAIRE (GBM)

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1124 Anti-GBM (Rein de Primate) 48 Tests

Test par immunofluorescence indirecte (IFA) pour la recherche et la détermination semi-quantitative des anticorps de la membrane basale anti-glomérulaire dans le sérum humain.

GENERALITES

La néphrite glomérulaire à développement rapide (RPGN) est un syndrome clinique développé des jours ou des semaines durant et caractérisée par une néphrite glomérulaire en croissance détectée par histopathologie du rein. Le pronostic est faible si elle n'est pas détectée suffisamment tôt et si un traitement approprié n'est pas délivré. La RPGN peut être détectée par un test de sérum par immunofluorescence indirecte et des évaluations au microscope électronique de biopsies rénales.

En utilisant les critères ci-dessus, la RPGN peut être classée en :

- maladie de complexe immunitaire caractérisée par la présence d'anticorps anti-ADN ou anti-streptocoques.
- néphrite glomérulaire et syndrome de Goodpasture de membrane basale anti-glomérulaire.
- néphrite glomérulaire associée aux anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques (ANCA).

Dans une étude conduite par Jane et ses collaborateurs¹, sur 889 patients suspectés de RPGN, 47 (5%) présentent des anti-GBM, 246 (28%) présentent des ANCA et 576 (65%) n'ont aucun de ces anticorps. 2% présentent les anticorps GBM et ANCA. La fréquence d'anti-GBM anticorps et les maladies associées sont énumérées dans le tableau 1.

PRINCIPES DE LA METHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte IFA, pour intensifier la coloration de fluorescence, le substrat est d'abord incubé avec un intensificateur d'antigène avant de le mettre en contact avec les échantillons à tester. Le sérum du patient est incubé sur des substrats de rein de singe, ce qui permet la fixation des anticorps avec le substrat. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgG humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps de classe IgG fixés. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert pomme de la membrane basale des glomérules du rein montre la présence d'anticorps anti-GBM. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions sériques successives.

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs entre 2°et 8°C. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Avant utilisation, attendre que les réactifs atteignent l'équilibre à la température ambiante du laboratoire.

Matériel fourni

ImmuGlo™ Anti-GBM (Rein de Primate) **REF** 1124

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 48 tests chacun.

8 x

SORB | **SLD** | **6**

Lames 6 puits avec **substrat de rein de singe**

FR

1 x 0,5 ml **CONTROL + GBM** *

Contrôle positif GBM. Sérum humain contenant des anticorps GBM.

1 x 0,5 ml **CONTROL - GBM** *

Contrôle négatif GBM, avec sérum humain.

1 x 5 ml **IgG-CONJ FITC** *

Conjugué d'anticorps FITC pour l'IgG humain.
Conserver à l'abri de la lumière.

1 x 5,0 ml **IgG-CONJ FITC EB** * †

Conjugué FITC anti-IgG humaines avec Bleu d'Evans. Maintenir à l'abri de la lumière.

1 x 5,0 ml **DIL-ENH GBM**

Tampon intensificateur d'antigènes

1 x 60 ml **BUF GBM** *

Diluant échantillon GBM.

2 x **BUF WASH**

Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre.

1 x 5,0 ml **MOUNTING MEDIUM** *

Milieu de montage. Ne pas congeler.

1 x 1,0 ml **EVANS**

Coloration de contraste Bleu Evans

1 x 12 **COVER SLD**

Lamelles couvre-lames.

* Contient < 0.1% NaN₃

† Remplace le conjugué sans counterstain dans des numéros de code contenant l'eb

Symboles utilisés sur les étiquettes:

LOT Numéro de lot

REF Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

IVD Pour usage diagnostique In vitro

 Fabricant

 Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Bac à coloration pour le lavage des lames (bac Coplin)
- Petits tubes (ex : 13 X 75 mm) et porte-tubes
- Eau distillée ou déionisée
- Epruvette graduée 1l

FR

- Flacon pour solution de lavage
- Serviettes en papier
- Chambre d'incubation

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage².

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN_3). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit composants par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

MODE OPERATOIRE

A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au **1:10** à l'aide du diluant échantillon fourni (0.1ml de sérum + 0.9ml de diluant). **Ne pas** diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des anticorps dans le cas où le dépistage serait positif.
2. Laisser les lames prendre la température du laboratoire pendant **10-15 minutes** dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat
3. Numéroter les lames et les placer dans la chambre humidifiée avec des serviettes en papier mouillées pour éviter le dessèchement.
4. Pipeter **1 à 2** gouttes de **tampon intensificateur d'antigènes** dans chaque puit. Placer les lames dans la chambre d'incubation et incubé **30 minutes** à température ambiante.
5. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette contenant environ **10 ml** de PBS ou rincer la lame dans un becher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant **10 minutes**. Répéter les opérations avec toutes les lames.
6. Retirer une (les) lame(s) du bac de coloration. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. Déposer la lame dans la chambre d'incubation. Placer un buvard sur les lames et presser doucement.
7. Retourner le flacon doseur et appuyer doucement pour déposer **1 goutte** (environ 50µl) de **Contrôle Négatif** sur le puit n°1. De la même façon déposer **1 goutte** de **Contrôle Positif** sur le puit n°2. Eviter de déborder des puits.

8. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer **1 goutte** (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder des puits.
9. Replacer le couvercle sur la chambre et incuber les lames **30 minutes** à température ambiante.
10. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette contenant environ **10 ml** de PBS ou rincer la lame dans un becher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant **10 minutes**. Répéter les opérations avec toutes les lames.
11. Retirer une (les) lame(s) du bac de coloration. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. Déposer la lame dans la chambre d'incubation. Retourner les flacons doseurs de **conjugué** et déposer immédiatement **1 goutte** (environ 50µl) dans chaque puit.
12. Replacer le couvercle sur la chambre d'incubation et incuber **30 minutes** à température ambiante.
13. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette contenant environ **10 ml** de PBS ou rincer la lame dans un becher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant **10 minutes**. Répéter les opérations avec toutes les lames.
REMARQUE: Un lavage incorrect peut augmenter le bruit de fond de fluorescence.
14. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. **Placer la lamelle couvre-lame tant que la lame est encore humide.** Déposer doucement 3 **gouttes** de milieu de montage dans chaque puit en déplaçant légèrement la lamelle couvre-lame. Pour éliminer toutes les bulles d'air, appliquer une légère pression sur les bords de la lamelle couvre-lame. Eviter de bouger la lamelle couvre-lame. Répéter l'opération avec chaque lame.
15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement **X200** ou plus.

Les lames peuvent être lues immédiatement. Cependant, grâce à la présence d'un agent anti-fading dans le milieu de montage, la lecture peut être retardée jusqu'à 48 heures sans perte significative de l'intensité de fluorescence. Dans ce cas les lames doivent être conservées à l'obscurité entre 2 et 8°C.

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les étapes **4 à 15** afin de définir son titre. Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à partir du 1:10 jusque 1:320. Si la dilution 1:320 est positive, le titre doit être reporté comme plus grand ou égal à 320. D'autres lamelles peuvent être utilisées pour obtenir le titrage de ces sérums positifs à 1:320. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Préparation des dilutions en série

Numéroter six tubes de 1 à 6. Ajouter 0.9 ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 6. Pipeter 0.1ml de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant. Continuer à transférer 0.2 ml d'un tube à l'autre en mélangeant bien chaque tube pour arriver aux dilutions suivantes :

Éprouvettes	1	2	3	4	5	6
Sérum	0,1 ml					
	+					
Solution de dilution	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Transfer		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilution finale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

CONTROLE DE QUALITE

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne doit pas donner d'image fluorescente des glomérules du rein tandis que le contrôle positif doit donner une fluorescence de 2+ minimum de la membrane basale des glomérules du rein.

FR

Dans le cas où les contrôles ne donneraient pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à :

- La turbidité. Eliminer le contrôle et en utiliser un nouveau.
- Au système optique du microscope. Par exemple: mauvais alignement, lampe ayant dépassé sa durée de vie, etc.
- A un assèchement des lames pendant la manipulation.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats des essais pour la recherche des anticorps anti-GBM doivent être considérés négatifs (<10), positifs (plus grands ou égal à 320), ou bien positifs avec le titre.

Ne tenir compte que des colorations linéaires de la membrane basale des glomérules du rein. Voir photo 1 à la fin de ce document.

LIMITES D'UTILISATION

Parfois un sérum anti-GBM positif peut donner un résultat faiblement positif ou négatif à la dilution de dépistage (effet de zone). Dans ces cas douteux, les sérums devront être testés à des dilutions supérieures et, si le résultat est positif, déterminer le titre des anticorps.

Parfois la présence de deux ou plus anticorps différents dans le sérum et ayant une réactivité vis-à-vis du même substrat, peut créer des interférences pour la détection en immunofluorescence. Cela peut masquer la détection des anticorps ou cacher le titre si l'anticorps qui interfère a un titre plus élevé que celui des anti-GBM.

VALEURS PREVUES

Les anticorps anti-GBM réagissent avec la membrane basale glomérulaire, la membrane basale tubulaire ou la membrane basale alvéolaire en formant une coloration de conformation continue et linéaire³. Les anticorps anti-GBM sont principalement de la classe des IgG. Environ 5% des patients présentant une néphrite glomérulaire à évolution rapide (RPGN) sont positifs à la recherche des anticorps anti-GBM¹. Le syndrome de Goodpasture (néphrite glomérulaire et hémorragie pulmonaire) représente les deux tiers des patients positifs aux anticorps anti-GBM. La RPGN et les formes plus atténuées de néphrite glomérulaire comptent pour un tiers. Parfois, les patients présentant des anticorps anti-GBM peuvent avoir seulement une complication pulmonaire⁴.

Les anticorps anti-GBM sont associés au syndrome de Goodpasture et au RPGN. Les anticorps anti-GBM en circulation sont présents chez 90% des patients atteints du syndrome de Goodpasture et 60% des patients souffrant de RPGN. Ces anticorps peuvent disparaître 4 à 8 mois après une néphrectomie bilatérale⁶.



IMMCO
DIAGNOSTICS

Test Anti-membrana Basale del Glomerulo (GBM) in IFA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1124 Anti-GBM (Rene di Scimmia) 48 Determinazioni

FINALITA' D'USO

Test di immunofluorescenza indiretta (IFA) per la rilevazione e la semiquantificazione di anticorpi anti-membrana basale del glomerulo (GBM) nel siero umano.

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 se non è riconosciuta precocemente e se non viene istituito un trattamento appropriato. La RPGN può essere determinata sulla base di test in immunofluorescenza indiretta del siero e per valutazione con microscopia ad elettroni delle biopsie renali.

Avvalendosi dei criteri menzionati sopra, la RPGN può essere classificata in:

- a) Una patologia mediata da un complesso immune, caratterizzata dalla presenza di anticorpi anti-DNA o anticorpi anti-streptococchi.
- b) Glomerulonefrite e sindrome di Goodpasture mediate da anticorpi anti-membrana basale del glomerulo.
- 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%) presentavano anticorpi anti-GBM, 246 (28%) anticorpi ANCA e 576 (65%) nessuno dei due anticorpi, mentre il 2% aveva anticorpi ANCA e anti-GBM. La frequenza di anti-GBM anticorpi e le malattie collegate sono elencate in tabella 1.

PRINCIPI DELLE METODICHE

In questo metodo IFA, per aumentare la fluorescenza specifica, il substrato tissutale viene incubato con un tampone favorente il legame anticorpo-antigene GBM specifico come step antecedente all'incubazione con i sieri dei pazienti. I sieri dei pazienti sono incubati su substrato di rene di scimmia per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Gli anticorpi non legati sono rimossi mediante lavaggio e quelli legati, di classe IgG sono individuati per incubazione del substrato con coniugato anti-IgG umane marcato con fluoresceina. Le reazioni si osservano per microscopia in fluorescenza usando filtri idonei.

La presenza di reazioni agli anticorpi anti-GBM è dimostrata da una fluorescenza verde mela della membrana basale del glomerulo del rene. I titoli (il valore reciproco della diluizione maggiore che produce una reazione positiva) sono poi determinati analizzando le diluizioni seriali.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. E' necessario, prima dell'uso, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.

Materiali forniti

Anti-GBM (Rene di Scimmia) ImmuGlo™ REF 1124

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 48 determinazioni ciascuno.

8 x

SORB	SLD	6
------	-----	---

Vetrini da 6 pozzetti, **Substrato Rene di Scimmia**









IT

1 x 0,5 ml	CONTROL + GBM *	Controllo Positivo GBM. Siero umano contenente anticorpi anti-GBM.
1 x 0,5 ml	CONTROL - GBM *	Controllo Negativo GBM. Contiene siero umano.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Coniugato FITC anti-IgG umane. Proteggere dalla luce.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB *†	Coniugato FITC anti-IgG umane con Blu di Evans. Proteggere dalla luce.
1 x 5 ml	DIL-ENH GBM	Tampone GBM specifico
1 x 60 ml	BUF GBM *	Diluyente Campione GBM.
2 x	BUF WASH	Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). Da ricostituire a 1 litro.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Liquido di montaggio. Non congelare.
1 x 1,0 ml	EVANS	Colorante di contrasto Blu di Evans.
1 x 12	COVER SLD	Vetrini coprioggetto.

* Contiene < 0,1% NaN₃

† Sostituisce il coniugato senza counterstain nei numeri di codice che contengono l'eb

Simboli usati sulle etichette:

	Numero di lotto
	Numero catalogo
	Scadenza
	Temperatura di conservazione
	Leggere le istruzioni per l'uso
	Usò diagnostico in vitro
	Produttore
	Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta Pasteur
- Pipette sierologiche
- Vaschetta per colorazione (ad es. vaschetta Coplin)
- Provette piccole per test (ad es. 13 x 75 mm) e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro.
- Flacone di lavaggio

IT

- Salviette di carta
- Camera umida per l'incubazione

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. 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 dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali².

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN₃) può 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 può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveneni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

Per questa procedura usare unicamente campioni di siero. I 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 a -20°C. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

Metodo del test

A. Screening

1. Diluire il siero del paziente **1:10** con il Diluente per Campioni fornito (0,1 ml di siero + 0,9 ml di diluente). **Non** diluire i Controlli Positivi o Negativi. Conservare il siero non diluito per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che le buste contenenti i vetrini raggiungano la temperatura ambiente per **10-15 minuti**. Rimuovere con attenzione il vetrino senza venire in contatto con il substrato.
3. Contrassegnare i vetrini e disporli nella camera umida sul cui piano interno saranno state poste delle salviette di carta inumidite con acqua per prevenire l'essiccazione.
4. Pipettare **1 o 2** gocce di **tampone favorente il legame anticorpo-antigene GBM specifico** in ciascun pozzetto. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per **30 minuti** a temperatura ambiente.
5. Rimuovere il vetrino dalla camera umida. reggerlo per l'estremità e irrorare delicatamente con circa **10 ml** di PBS usando una pipetta, oppure sciacquare il vetrino in un recipiente contenente PBS. Non usare flaconi di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino in una vaschetta Coplin di lavaggio e attendere per **10 minuti**. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
6. Rimuovere il vetrino dalla vaschetta Coplin, scuotere via il liquido in eccesso e collocare il vetrino nella camera umida. Posizionare della carta assorbente sul vetrino e premere delicatamente.
7. Applicare **1 goccia** (circa 50 µl) di **Controllo Negativo** nel pozzetto #1. Allo stesso modo applicare **1 goccia** di **Controllo Positivo** nel pozzetto #2. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
8. Usando una micropipetta o pipetta Pasteur, applicare **1 goccia** di siero diluito del paziente (circa 50 µl) negli altri pozzetti. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
9. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per **30 minuti** a temperatura ambiente.

10. Rimuovere il vetrino dalla camera umida. reggerlo per l'estremità e irrorare delicatamente con circa **10 ml** di PBS usando una pipetta, oppure sciacquare il vetrino in un recipiente contenente PBS. Non usare flaconi di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino in una vaschetta Coplin di lavaggio e attendere per **10 minuti**. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
11. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. Posizionare il vetrino nella camera umida. Applicare immediatamente **1 goccia** (circa 50 µl) di **Coniugato** in ciascun pozzetto. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
12. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per **30 minuti** a temperatura ambiente.
13. Rimuovere il vetrino dalla camera umida. reggerlo per l'estremità e irrorare delicatamente con circa **10 ml** di PBS usando una pipetta, oppure sciacquare il vetrino in un recipiente contenente PBS. Non usare flaconi di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino in una vaschetta Coplin di lavaggio e attendere per **10 minuti**. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini. **NOTA:** Un lavaggio inadeguato può causare un aumento nella fluorescenza di fondo.
14. Rimuovere un vetrino dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. **Mentre il vetrino è ancora umido montare il vetrino coprioggetto.** Applicare **3 gocce** di liquido di montaggio uniformemente sul coprioggetto e invertire il vetrino sul coprioggetto. Per rimuovere le bolle d'aria esercitare una leggera pressione lungo l'estremità del vetrino coprioggetto. Evitare gli spostamenti del coprioggetto. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
15. Esaminare la fluorescenza specifica mediante microscopia a fluorescenza con ingrandimento 200x o superiore.

I vetrini possono essere letti appena montati. Tuttavia, per la presenza di un agente antiscolorimento nel liquido di montaggio, non si verificano perdite significative di intensità di colorazione e la lettura può essere effettuata nelle 48 ore successive alla preparazione. I vetrini devono essere conservati in assenza di luce a 2-8°C.

B. Determinazione Endpoint (Titolazione)

Titolazione seriali doppia a partire da 1:10 (vedere sotto). Usando un vetrino, un siero può essere testato a diluizioni comprese tra 1:10 e 1:320. Se positivo a una diluizione 1:320, il titolo viene riportato come superiore o uguale a 320. Possono essere utilizzati ulteriori vetrini per ottenere l'endpoint per quei sieri ancora positivi a una diluizione 1:320. Il reciproco del valore della più alta diluizione eseguita a cui il campione mostra positività è il valore del titolo.

Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare 6 provette da 1 a 6. Aggiungere 0,9 ml di Diluente del Campione nella provetta 1 e 0,2 ml nelle provette da 2 a 6. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e mescolare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta alla successiva, dopo la miscelazione, per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

Provette	1	2	3	4	5	6
Siero	0,1 ml					
	+					
Diluente	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Tamponato						
		⇌	⇌	⇌	⇌	⇌
Trasferimento	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Diluizione finale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

CONTROLLO DI QUALITÀ

In ogni serie di test dovrebbero essere inclusi un Controllo Positivo e un Controllo Negativo. Il controllo negativo non dovrebbe evidenziare alcuna fluorescenza specifica dei glomeruli renali, mentre il controllo positivo dovrebbe mostrare un'intensità 2+ o maggiore della membrana basale glomerulare.

Se non si ottengono i risultati attesi, la procedura dovrebbe essere ripetuta. Se i controlli continuano a produrre risultati discordanti, ciò può essere dovuto a:

- Torbidità. Smaltire e usare un nuovo controllo.
- Problemi legati al sistema ottico del microscopio a fluorescenza: allineamento non idoneo, lampada oltre la durata utile prevista, ecc.
- Aver lasciato asciugare il vetrino durante la procedura.

RISULTATI

I risultati dei test per gli anticorpi anti-GBM dovrebbero essere riportati come negativi con titolo inferiore a 10, positivi con titolo superiore o uguale a 320 o, preferibilmente, positivi con relativo titolo. Per osservare la colorazione lineare specifica della membrana basale dei glomeruli del rene, vedere foto 1 alla fine di questo foglio.

LIMITAZIONI DEL TEST

In alcuni casi, i sieri positivi per gli anticorpi anti-GBM possono essere o molto deboli o negativi alla diluizione iniziale di screening (fenomeno prozona). In questi casi dubbi, i sieri dovrebbero essere analizzati a diluizioni maggiori e, se positivi, dovranno essere determinati i titoli anticorpali.

Nel caso in cui in un siero siano presenti due o più anticorpi reattivi con lo stesso substrato, può verificarsi un'interferenza nel rilevamento per immunofluorescenza. L'interferenza può risultare in mancata individuazione degli anticorpi anti-GBM o in soppressione del titolo se l'anticorpo interferente ha un titolo più alto di quello degli anticorpi anti-GBM.

VALORI ATTESI

Gli anticorpi anti-GBM reagiscono con la membrana basale glomerulare, la membrana basale tubulare o la membrana basale degli alveoli con un pattern lineare continuo³. Gli anticorpi anti-GBM sono principalmente di classe IgG. Circa il 5% dei pazienti con glomerulonefrite a progressione rapida (RPGN) sono positivi agli anticorpi anti-GBM¹. La sindrome di Goodpasture (glomerulonefrite e emorragia polmonare) si riscontra nei due terzi dei pazienti positivi per gli anticorpi anti-GBM, la RPGN e altre forme più lievi di glomerulonefriti nel restante terzo. Occasionalmente, i pazienti con anticorpi anti-GBM possono presentare unicamente il coinvolgimento polmonare.

Gli anticorpi anti-GBM sono associati con la sindrome di Goodpasture e la RPGN. Gli anticorpi anti-GBM circolanti sono presenti nel 90% dei pazienti con sindrome di Goodpasture e nel 60% dei pazienti con RPGN. Questi anticorpi possono scomparire in 4-8 mesi in seguito a nefrectomia bilaterale⁵.

PT



Sistema de teste para anticorpos anti-membrana basal glomerular (GBM)

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1124 Anti-GBM (Rim de Primata) 48 Determinações

APLICAÇÃO

É um teste de anticorpos por imunofluorescência indirecta (IFA) para detecção e semiquantificação de anticorpos anti-membrana basal glomerular (GMB) em soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A glomerulonefrite de progressão rápida (GNPR) é uma síndrome clínica que se desenvolve em dias ou semanas, caracterizada por uma glomerulonefrite progressiva, que se pode observar em exames histopatológicos do rim. Se não for reconhecida rapidamente e se não for instituído um tratamento adequado, tem um mau prognóstico. A glomerulonefrite de progressão rápida pode ser avaliada através de estudos de imunofluorescência indirecta do soro e observações de biopsias renais ao microscópio electrónico.

Usando-se os critérios acima descritos, a glomerulonefrite de progressão rápida pode ser classificada em:

- Doença mediada por complexos imunes caracterizada pela presença de anticorpos anti-ADN ou de anticorpos anti-estreptococos.
- Glomerulonefrite mediada por anticorpos anti-membrana basal glomerular (GMB) e síndrome de GoodPasture.
- Glomerulonefrite associada a anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA).

Num estudo realizado por Jayne *et al*¹, com 889 doentes suspeitos de ter glomerulonefrite de progressão rápida, 47 (5%) tinham anticorpos anti-GBM, 246 (28%) tinham anticorpos ANCA e 576 (65%) não tinham nenhum dos dois. 2% dos doentes tinham ambos anticorpos. A frequência de anti-GBM anticorpos e as doenças associadas são alistadas na tabela 1.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Neste método IFA, para se aumentar a coloração específica de fluorescência, o substrato de tecido é inicialmente incubado em um tampão intensificador de antigénio, antes da incubação com o soro do doente. O soro do doente é incubado em substrato de rim de macaco para se permitir a ligação dos anticorpos ao substrato. Os anticorpos não ligados são removidos com uma lavagem. Os anticorpos ligados da classe IgG são detectados através da incubação do substrato com conjugado IgG anti-humano marcado com fluoresceína. As reacções são observadas num microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados.

A presença de reacções a anticorpos anti-GBM é demonstrada por uma fluorescência verde-maçã da membrana basal dos glomérulos do rim.

O título (o equivalente da diluição mais alta com reacção positiva) é, então, determinado através da análise de diluições seriadas do soro.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

Conservação e preparação

Conservar todos os reagentes à temperatura de 2 a 8 °C. Os reagentes estão prontos a usar depois de estabilizarem à temperatura ambiente.

Materiais fornecidos

Anti-GBM (Rim de Primata) ImmuGlo™ REF 1124

Cada kit contém uma quantidade de reagentes suficiente para 48 determinações.






PT

8 x	SORB SLD 6	6 poços lâminas de substrato de rim de macaco
1 x 0,5 ml	CONTROL + GBM *	Controlo GBM positivo. Soro humano com anticorpos anti-GBM.
1 x 0,5 ml	CONTROL - GBM *	Controlo GBM negativo. Contém soro humano.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Conjugado de IgG anti-humana com FITC. Proteger da luz.
1 x 5,0 ml	IgG-CONJ FITC EB * †	Conjugado de IgG anti-humana com FITC contendo azul de Evans. Proteger da luz.
1 x 5,0 ml	DIL-ENH GBM	Tampão intensificador de antigénio.
1 x 60 ml	BUF GBM *	Diluyente da amostra GBM.
2 x	BUF WASH	Soro fisiológico com tampão fosfato (PBS). Dissolver cada frasco em um litro.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Meio de montagem. Não congelar.
1 x 1.0 ml	EVANS	Contrastante azul de Evans.
1 x 12	COVER SLD	Lamela.

* Contém < 0,1% NaN₃

† Substitui o conjugado sem o counterstain nos números de código que contêm o EB

Símbolos utilizados nos rótulos:

LOT	Número de lote
REF	Número de catálogo
	Prazo de validade
	Temperatura de armazenamento
	Ler as instruções de utilização
IVD	Utilização em diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Número de testes

Materiais necessários não fornecidos

- Microscópio de fluorescência
- Micropipetas ou pipeta de Pasteur
- Pipetas serológicas
- Recipiente de coloração (por exemplo, frasco de Coplin)
- Pequenos tubos para teste (por exemplo, 13 x 75 mm) e suporte para tubos de teste
- Água destilada ou desionizada

PT

- Recipiente de 1 litro
- Frasco de lavagem
- Toalhetes de papel
- Câmara de incubação

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Para ser usado no diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana usados foram testados para HbsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo nos testes requeridos pela FDA. Todas as amostras de soro humano e produtos obtidos em seres humanos devem ser tratados como se fossem potencialmente perigosos, independente da sua origem. Observe boas práticas laboratoriais na conservação, preparação e eliminação destes materiais².

ADVERTÊNCIA — A azida de sódio (NaN_3) pode reagir com a canalização de cobre e chumbo formando azidas altamente explosivas. Elimine líquidos juntamente com água em abundância para evitar a formação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Em caso de ingestão acidental, informar imediatamente o responsável do laboratório ou o centro anti-venenos.

As instruções devem ser seguidas exactamente como estão indicadas no folheto do kit, para assegurar resultados válidos. Não misture componentes do kit com componentes de outras origens que não sejam do mesmo número de lote da Immco Diagnostics Inc. Não use o kit e seus componentes após o prazo de validade indicado no rótulo.

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Neste procedimento, só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com contaminação microbiana podem interferir com o desempenho deste teste e, portanto, não devem ser utilizadas. Conserve as amostras por, no máximo, uma semana a 2–8 °C. Para conservar as amostras de soro por mais tempo, é necessário congelá-las a –20 °C. Evite ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras.

PROCEDIMENTO

Método do teste

A. Despiste

1. Dilua o soro de cada doente com a solução tampão fornecida na proporção de **1:10** (0,1 ml de soro + 0,9 ml de diluente). Não dilua controlos positivos ou negativos. Conserve o soro não diluído para determinar os títulos de anticorpos se as análises derem resultado positivo.
2. Deixe as bolsas contendo lâminas de substrato à temperatura ambiente por **10-15 min**.
3. Ponha a etiqueta nas lâminas e coloque-as numa câmara de incubação revestida com toalhetes de papel humedecidos com água para evitar secagem.
4. Pipete **1** ou **2** gotas de tampão intensificador de antigénio para cada poço. Coloque a tampa na câmara de incubação e incube por **30 min** à temperatura ambiente.
5. Remova uma lâmina da câmara de incubação. Segure a lâmina pela extremidade com etiqueta e enxagúe levemente com aproximadamente **10 ml** de PBS com o auxílio de uma pipeta, ou enxagúe a lâmina numa proveta cheia de PBS. Não utilize o frasco de lavagem. Transfira a lâmina imediatamente para o frasco de Coplin e lave por **10 min**. Repita o procedimento com todas as lâminas restantes.
6. Remova a lâmina do frasco de Coplin e elimine o excesso de líquido sacudindo-a; coloque a lâmina na câmara de incubação. Coloque papel absorvente com cuidado sobre a lâmina e pressione levemente.
7. Inverta o frasco conta-gotas e aperte levemente para aplicar **1 gota** (aproximadamente 50 µl) do **controlo negativo** na poço n.º 1. Do mesmo modo, aplique **1 gota** de **controlo positivo** na poço n.º 2. Evite o enchimento excessivo dos poços.

8. Servindo-se de uma micropipeta ou pipeta de Pasteur, aplique **1 gota** do soro diluído do doente (aproximadamente 50 µl) nos outros poços. Evite o enchimento excessivo dos poços.
9. Coloque a tampa na câmara de incubação e incube por **30 min** à temperatura ambiente.
10. Remova uma lâmina da câmara de incubação. Segure a lâmina pela extremidade com etiqueta e enxagúe levemente com aproximadamente **10 ml** de PBS com o auxílio de uma pipeta, ou enxagúe a lâmina numa proveta cheia de PBS. Não utilize o frasco de lavagem. Transfira a lâmina imediatamente para o frasco de Coplin e lave por **10 min**. Repita o procedimento com todas as lâminas restantes.
11. Enxugue a extremidade da lâmina com uma toalha de papel para remover o excesso de PBS. Coloque a lâmina na câmara de incubação. Inverta o frasco conta-gotas do **conjugado** e aperte levemente para aplicar **1 gota** (aproximadamente 50 µl) em cada poço. Repita o procedimento com todas as lâminas restantes.
12. Recoloque a tampa na câmara de incubação e incube por **30 min** à temperatura ambiente.
13. Remova uma lâmina da câmara de incubação. Segure a lâmina pela extremidade com etiqueta e enxagúe levemente com aproximadamente **10 ml** de PBS com o auxílio de uma pipeta, ou enxagúe a lâmina numa proveta cheia de PBS. Não utilize o frasco de lavagem. Transfira a lâmina imediatamente para o frasco de Coplin e lave por **10 min**. Repita o procedimento com todas as lâminas restantes. **NOTA:** uma lavagem imprópria pode levar a um incremento da fluorescência de fundo.
14. Remova uma lâmina do frasco de Coplin. Enxugue a extremidade da lâmina com um toalhete de papel para remover o excesso de PBS. **Enquanto a lâmina ainda estiver húmida, monte a lamela.** Coloque **3 gotas** do meio de montagem à mesma distância sobre uma lamela e inverta a lâmina sobre a lamela de cobertura. Para remover as bolhas de ar, faça pressão ao longo do bordo da lamela. Evite todo e qualquer movimento da lamela. Repita o procedimento com todas as lâminas restantes.
15. Examine a fluorescência específica num microscópio de fluorescência com um aumento de **200x** ou mais.

As lâminas devem ser lidas assim que estiverem prontas. Contudo, por causa da presença no meio de montagem de um agente antidescoloração, não ocorre uma perda significativa de intensidade da coloração se a leitura for adiada até um máximo de 48 h. As lâminas devem ser conservadas no escuro a uma temperatura de 2–8 °C.

B: Determinação do ponto final (Titulação)

Um soro positivo no despiste pode ser analisado outra vez seguindo as etapas de 4 a 15 para se determinar o título. Cada teste feito deve incluir os controlos positivo e negativo. Faça diluições de soro duplas, começando com 1:10 (ver abaixo). Usando uma lâmina, um soro deve ser analisado em diluições de 1:10 a 1:320. Se o resultado for positivo com uma diluição de 1:320, o título é registado como igual ou maior a 320. Lâminas adicionais podem ser utilizadas para se obter pontos finais para os soros ainda positivos numa diluição de 1:320. O recíproco da diluição maior a produzir uma reacção positiva é o título.

Preparação das diluições em série

Numere seis tubos de 1 a 6. Adicione 0,9 ml de solução tampão ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 6. Pipete 0,1 ml de soro não diluído para o tubo 1 e misture completamente. Transfira 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e misture completamente. Continue a transferir 0,2 ml de um tubo para o próximo após misturar para produzir as diluições enumeradas na tabela abaixo:

Tubos	1	2	3	4	5	6
Soro	0,1 ml					
	+					
Diluyente tampão	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transferir		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluição final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

CONTROLO DE QUALIDADE

Ambos os controlos, positivo e negativo, devem ser incluídos em cada teste realizado. O controlo negativo não deve mostrar fluorescência específica dos glomérulos de rim, enquanto o controlo positivo deve apresentar manchas de intensidade 2+ ou maior da membrana basal dos glomérulos do rim.

Se os resultados esperados não forem obtidos, o procedimento deve ser repetido. Se os resultados inadequados continuarem a ocorrer com os controlos, isso pode ser devido a:

- Turvação. Descartar e usar outro controlo.
- Problemas com o sistema óptico do microscópio de fluorescência. Eles podem incluir: alinhamento impróprio, uso da lâmpada para além da vida útil prevista, etc.
- Permitir que a lâmina seque durante o procedimento.

RESULTADOS

Os resultados dos testes para anticorpos anti-GBM devem ser registados como negativos (< 10), positivos igual ou maior a 320, ou, de preferência, positivo com título.

Leitura para coloração específica linear da membrana basal dos glomérulos do rim. Veja a fotografia 1 no final deste documento.

LIMITES DO PROCEDIMENTO

Em alguns casos, soros positivos para anticorpos anti-GBM podem ser muito fracos ou negativos na diluição de despiste inicial (fenómeno pró-zona). Nestes casos duvidosos, os soros devem ser analisados em diluições mais altas e, se possível, os títulos de anticorpos devem ser determinados.

Em alguns casos, a presença de dois ou mais anticorpos num soro reactivo com o mesmo substrato pode causar uma interferência na detecção deles através de imunofluorescência. Essa interferência pode causar uma incapacidade em se detectar anticorpos anti-GBM ou a supressão do título se o anticorpo interferente tiver um título maior do que os anticorpos anti-GBM.

VALORES ESPERADOS

Os anticorpos anti-GBM reagem com a membrana basal glomerular, com a membrana basal tubular ou com a membrana basal alveolar com um padrão contínuo e linear³. Os anticorpos anti-GBM são, em primeiro lugar, da classe IgG. Aproximadamente 5% dos doentes com glomerulonefrite de progressão rápida (GNPR) são positivos aos anticorpos anti-GBM¹. Na síndrome de GoodPasture (glomerulonefrite e hemorragia pulmonar) cerca de dois terços dos doentes são positivos aos anticorpos anti-GBM. A glomerulonefrite de progressão rápida e as formas menos graves de glomerulonefrite constituem o outro terço. Ocasionalmente, doentes com anticorpos anti-GBM podem ter somente afecção pulmonar⁴.

Os anticorpos anti-GBM estão associados à síndrome de GoodPasture e à glomerulonefrite de progressão rápida. Os anticorpos anti-GBM circulam em 90% dos doentes com síndrome de GoodPasture e em 60% dos doentes com glomerulonefrite de progressão rápida. Estes anticorpos podem desaparecer 4-8 meses depois de nefrectomia bilateral⁵.

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Jayne DRW, Marshall PD, Jones SJ and Lockwood CM. Autoantibodies to GBM and neutrophil cytoplasm in rapidly progressive glomerulonephritis. *Kidney Int* 37:965-970, 1990.
2. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control, National Institute for Health.(HHS Pub. No {CDC} 93-8395) 1999.
3. Wilson CB. Radioimmunoassay for anti-glomerular basement membrane antibodies. In "Manual of Clinical Immunology," Rose N and Friedman H (Eds), 2nd ed, ASM, pp 376-379, 1980.
4. Wilson CB and Dixon FJ. Renal injury from immune reactions involving antigens in or of the kidney. In "Contemporary Issues in Nephrology", Wilson CB, Brenner BM and Stein JH (Eds), Vol 3, Churchill Livingstone, New York, pp 35-66, 1979.
5. Jenis EM and Lowenthal DT. *Kidney Biopsy Interpretation*. FA Davis Co. Philadelphia, 1977.
6. Fish AJ, Kleppel M, Jeraj K and Michael AF. Enzyme immunoassay of anti-glomerular basement membrane antibodies. *J Clin Med* 105:700-705, 1985. 11

Photo 1. Positive GBM staining reaction on monkey kidney, 200X. Note staining of the basement membrane of the glomeruli.

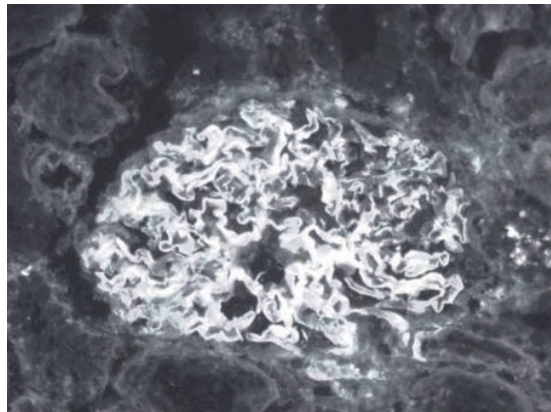


Table 1. Frequency of Anti-GBM Antibodies

Disease Group	% Positive
Anti-GBM nephritis	100
Anti-TBM nephritis	0
Vasculitis	0
Anaphylactoid purpura nephritis	0
Systemic lupus erythematosus	0
Membranoproliferative glomerulonephritis	0
IgA nephropathy	0
Normals	0

Adapted from Fish AJ et al.⁶



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 Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

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

www.emergogroup.com