



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

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 38637 *Anti-GBM (Rein de Primate) 48 Tests*

REF 38072 *Lamelle Anti-GBM (Rein de Primate) 6 Puits*

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 croissant 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.

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

Menarini™ Anti-GBM (Rein de Primate) **REF** 38637

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**



- 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'usage²².

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.


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

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

 1 x 5,0 ml **IgG-CONJ FITC EB** *

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

 1 x 60 ml **BUF GBM** *

 2 x **BUF WASH**

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

 1 x 12 **COVER SLD**
Composants en option

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

 1 x 1,0 ml **EVANS**

 * Contient < 0.1% NaN₃
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
- Eprouvette graduée 1l

Contrôle positif GBM. Sérum humain contenant des anticorps GBM.

Contrôle négatif, avec sérum humain.

Conjugué FITC anti-IgG humaines avec Bleu d'Evans. Maintenir à l'abri de la lumière.
Tampon intensificateur d'antigènes
Diluant échantillon GBM.
Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre.

Milieu de montage. Ne pas congeler.

Lamelles couvre-lames.
REF 38009. Conjugué d'anticorps FITC pour l'IgG humain. Conserver à l'abri de la lumière.

REF 38014 Coloration de contraste Bleu Evans



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.



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. Voir tableau 1 à la fin de ce document.



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) 1993.
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.

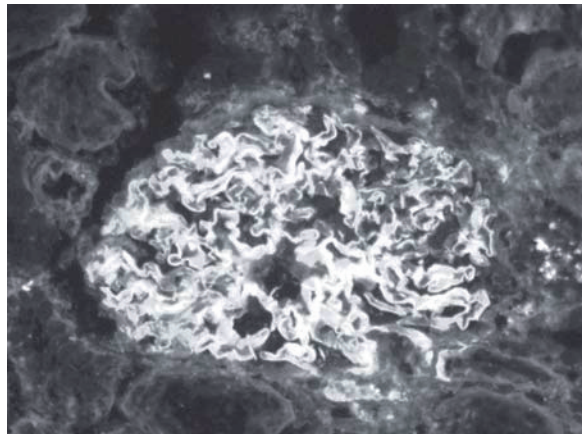


Table 1. Frequency of Anti-GBM Antibodies

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



A. Menarini Diagnostics S.r.l.
via Sette Santi 3
50131 Firenze
Italia

EL

Διανέμεται στην
ΕΛΛΑΔΑ από την
A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argypoulos
Attiki

AT

ÖSTERREICH
Vertrieb durch
A. Menarini Ges.m.b.H
Pottendorfer Straße, 25/27
A - 1120 Wien

BE

BELGIQUE
Distribué par
A. Menarini Diagnostics
Benelux S.A./N.V.
Belgicastraat, 4
1930 Zaventem

PT

PORTUGAL
Distribuido por
A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2ºB
2770-203 Paço de Arcos

NL

NEDERLAND
Distributed by
A. Menarini Diagnostics
Benelux N.V.
De Haak, 8
5555 XK Valkenswaard

Date of issue: March 2007
Data de publicação: Março de 2007
Ausgabedatum: März 2007
Date d'émission : Mars 2007
Ημερομηνία έκδοσης: Μάρτιος 2007

Document No. PI4124 CE M

