

**Instruction**

**Zenit a-GBM semi quantitative kit  
(Goodpasture syndrome)**

**Enzyme immunoassay for detection of autoantibodies  
against glomerular basement membrane**

Microtitration strips (12x8) 96 wells  
Store the kit at +2-8°C  
For in vitro diagnostic use only



Document No. E-23-0165-02 M  
June, 2009

**Zenit a-GBM semi quantitative kit  
(Goodpasture syndrome)**

English:	page .....	2
Français:	page .....	9
Español:	página .....	17
Deutsch:	Seite .....	21
Italiano:	pagina .....	25
Português:	pagina .....	29
Ελληνικά:	σελ. ....	33

**REF** 40890

**IVD**



96

## **INTENDED USE**

The Zenit anti GBM test kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection and semi-quantitation of IgG antibodies to glomerular basement membrane (GBM) in human sera. The assay is used to detect antibodies in a single serum specimen. The results of the assay are to be used as an aid to the diagnosis of Goodpasture syndrome. The analysis should be performed by trained laboratory professionals.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

## **Summary and explanation**

Goodpasture syndrome is characterised by lung haemorrhage, renal failure and the presence of anti-GBM antibodies. Diagnosis is based on clinical signs of lung hemorrhage and rapidly progressive glomerulonephritis combined with findings of anti-GBM antibodies.

As there are several other autoimmune diseases which may present with similar symptoms, this kit is a useful aid in differentiation between these diseases.

Less than one third of patients with reno-pulmonary syndromes have antibodies against the Goodpasture antigen, the majority having either Proteinase 3-ANCA or Myeloperoxidase-ANCA (1). Historically, indirect immunofluorescence was used to detect anti-GBM antibodies. When the first ELISA based on a collagenase digest was published in 1981 (2), assays using crude extracts were the only alternative. In 1984 the specific antigen was shown to derive from the C-terminal domain of type IV collagen (alpha 3 chain) (3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13) and sensitive and specific assays were subsequently developed (8). The molecular nature of the Goodpasture antigen is reviewed in (9, 14). The antigen is characterised by a restricted tissue distribution occurring mainly in kidney and lungs 10).

The sensitivity and specificity of ELISA to detect anti-GBM antibodies is high (15). False positive reactions occur, mainly in SLE and other diseases with polyclonal activation, most of which yield low titers of 10-20 U/ml.

## **Principle of the Zenit anti-GBM kit**

The wells of the microtitre strips are coated with purified GBM antigen (alfa 3 chain). During the first incubation, specific antibodies in diluted serum, will bind to the antigen coating.

The wells are then washed to remove unbound antibodies and other components.

A conjugate of alkaline phosphatase-labelled antibodies to human IgG binds to the antibodies in the wells in this second incubation.

After a further washing step, detection of specific antibodies is obtained by incubation with substrate solution. The amount of bound antibodies correlates to the colour

intensity and is measured in terms of absorbance (optical density (OD)). The absorbance is then calculated against a calibrator curve and the results are given in arbitrary U/ml.

## **Warnings and precautions**

- For in vitro diagnostic use.
- The human serum components used in the preparation of the controls and calibrators in the kit have been tested for the presence of antibodies to human immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatitis C (HCV) as well as hepatitis B surface antigen by FDA approved methods and found negative. Because no test methods can offer complete assurance that HIV, HCV, hepatitis B virus, or other infectious agents are absent, specimens and human-based reagents should be handled as if capable of transmitting infectious agents.
- The Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health recommended that potentially infectious agents be handled at the Biosafety Level 2.
- All solutions contain proclin 300 as a preservative. Never pipette by mouth or allow reagents or patient sample to come into contact with skin. Reagents containing proclin may be irritating. Avoid contact with skin and eyes. In case of contact, flush with plenty of water.
- The concentrations of anti-GBM in a given specimen determined with assays from different manufacturers can vary due to differences in assay methods and reagent specificity

### **Specimen collection**

The anti-GBM assay is for use with serum. Handle as if capable of transmitting infectious agents. Avoid using sera which are icteric, lipemic and hemolyzed.

Heat-inactivated sera can yield unspecific reactivities and should not be used.

Store serum between 2-8° C if testing will take place within five days. If specimens are to be kept for longer periods, store at -20° C or colder. Do not use a frost-free freezer because it may allow the specimens to go through freeze-thaw cycles and degrade antibody. Samples that are improperly stored or are subjected to multiple freeze-thaw cycles may yield spurious results.

The NCCLS provides recommendations for storing blood specimens, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

### **Kit components and storage of reagents**

- One frame with strips (12x8) coated with GBM antigen (alfa 3 chain) one lid sealed in a foil pack with a dry pack.
- 1,5 ml negative control (NC) containing human serum in diluent.
- 1,5 ml positive control (PC) containing human serum in diluent.
- 13 ml conjugate containing alkaline phosphatase-labelled antibodies to human IgG (blue colour).
- 32 ml Diluent (Dil) containing PBS (red colour).
- 13 ml Substrate pNPP.
- 30 ml wash solution 30x concentrated.
- Five calibrators containing human serum in diluent. 1.5 ml Cal 1 = 320 U/ml, 1.5 ml Cal 2 = 160 U/ml, 1.5 ml Cal 3 = 80 U/ml, 1.5 ml Cal 4 = 40 U/ml, 1.5 ml Cal 5 = 10 U/ml.

All reagents in the kit are ready for use except wash solution and should be stored at 2-8°C.

Remove only the number of strips needed for testing, resealing the aluminium package carefully.

### **Materials or equipment required but not provided**

- Microplate reader with filter 405 nm.
- Precision pipettes with disposable tips.
- Washer for strips, absorbent tissue, tubes and a timer.

### **PROCEDURE**

All solutions should be used at room temperature. Incubate in all steps at room temperature (20-25°C) with lid. Incubate serum for 30 minutes, conjugate for 30 minutes and substrate for 60 minutes ( $\pm$  10 minutes).

### **Preparation of washing solution**

Dilute 10 ml of the 30x concentrated wash solution in 290 ml distilled water. When stored at 2-8°C, the diluted wash solution is stable until the date of expiration of the kit.

### **Dilution of serum and incubation**

Dilute the patient's serum 1/80 with diluent (395  $\mu$ l diluent +5  $\mu$ l serum).

Pipet 100 $\mu$ l/well in duplicate of diluent (as a blank), Calibrator 1, 2, 3, 4, 5, NC, PC and diluted patient's serum (P) according to the diagram below. Incubate for 30 minutes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dil	Cal 4	P1									
B	Dil	Cal 4	P1									
C	Cal 1	Cal 5	P2									
D	Cal 1	Cal 5	P2									
E	Cal 2	NC	etc									
F	Cal 2	NC										
G	Cal 3	PC										
H	Cal 3	PC										

### After serum incubation

Wash 3 times with 300 µl washing solution / well, filling and emptying the wells each time; after the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue.

### Adding conjugate

Add 100 µl conjugate to each well. Incubate for 30 minutes.

### After conjugate incubation

Wash as before.

### Adding substrate solution

Add 100 µl substrate pNPP to each well, incubate for 60 minutes ( $\pm$  10 minutes).  
Read the absorbance at 405 nm on a microplate reader.

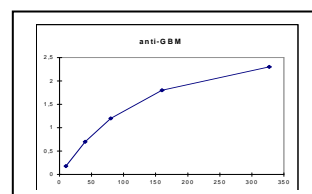
### Calculations

Subtract the OD value for the blank from the other OD values.

Construct a calibrator curve by plotting the OD against the U/ml values of the 5 calibrators. The five calibrators provided have been assigned arbitrary values of 320 U/ml for calibrator 1, 160 U/ml for calibrator 2, 80 U/ml for calibrator 3, 40 U/ml for calibrator 4 and 10 U/ml for calibrator 5. Read the U/ml value of the patient from the constructed curve. Values greater than 320 should be reported as >320, or reassay them with a higher dilution.

Arbitrary U/ml have been adopted by Zenit, as no generally recognised international standard exists for expressing GBM titres.

<u>Example:</u>	<u>Calibrator</u>	<u>U/ml</u>	<u>Absorbance</u>
	1	320	2.3
	2	160	1.8
	3	80	1.2
	4	40	0.7
	5	10	0.18



A sample with an absorbance value of 0.7 will read on the X-axis as having 40 U/ml of anti-GBM.

**Important:** The curve is an example and should not be used for actual patient interpretation.

### Quality Control

The OD for the negative control should be less than that of calibrator 5.

The OD for calibrator 1 should be > 1,0

The value for the positive and negative controls see lot certificate.

The negative and positive controls are intended to monitor for substantial reagent failure. The positive control will not ensure precision at the assay cut-off. It is recommended to assay an additional control at the assay cut-off.

If any of the values are not within their respective ranges, the test should be considered invalid and the test should be repeated. Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organisations. Refer to NCCLS C24-A for guidance on appropriate QC practices.

### Interpretation of results

< 10 U/ml = **Negative**

10-20 U/ml = **Equivocal**; Retest, if still equivocal retest by an alternative method or test a new sample

>20 U/ml = **Positive**

### Limitations

The individual patient's antibody titre can not be used as a measure of disease severity, as antibodies from different patients may differ from each other in affinity. Thus, it is difficult to obtain an absolute standardisation of results.

The test should not be relied upon as the sole basis of decisions on clinical therapy, but should be used as an adjunct to clinical symptoms and the results of other available tests.

Sera from patients with other autoimmune diseases and from normal individuals may contain potentially cross-reactive autoantibodies. Some individuals may be positive for anti-GBM antibodies with little or no evidence of clinical disease. On the other hand, some patients with active disease may have undetectable levels of these antibodies.

Immunosuppressive therapy should not be started on basis of a positive anti-GBM result. Initiation or changes in treatment should not be based on changes in anti-GBM concentration alone, but rather on careful clinical observation.

### Expected results

Anti-GBM are rarely found in normal healthy individuals. The anti-GBM ELISA was tested with 120 normal sera. 120 were found to be negative. The annual incidence of Goodpasture syndrome is one per million inhabitants per year.

Anti-GBM antibodies are found in the sera of most Goodpasture syndrome patients. The anti-GBM ELISA was tested with 40 GP sera, 38 (95%) were found to be positive.

### Performance characteristics

**Table 1. Clinical sensitivity and specificity.** A total of 199 frozen retrospective sera with clinical characterisation were assayed. The following table summarises the results

Control and Disease groups	Total number	Negative <10 U/ml	Equivocal 10-20 U/ml	Positive >20 U/ml
<b>Blood donors:</b>	80	80	0	0
<b>WG / MP</b>	27	27	0	0
<b>SLE:</b>	19	19	0	0
<b>Others:</b>	33	33	0	0
<b>Anti-GBM:</b>	40	0	2	38

WG = Wegener's granulomatosis, MP = microscopic polyangiitis

SLE = systemic lupus erythematosus Others = RA, UC, etc.

GBM = glomerular basement membrane

### Clinical sensitivity (Equivocal samples excluded from calculations)

GBM = 38/38 = 100 %

95% CI = 90.7-100 %

**Clinical specificity (Equivocal samples excluded from calculations)**

WG/MP	= 27/27 = 100 %	95% CI = 87.2-100 %
SLE	= 19/19 = 100 %	95% CI = 82.4-100 %
Others	= 33/33 = 100 %	95% CI = 89.4-100 %
Donors	= 80/80 = 100 %	95% CI = 95.5-100 %

The 95% confidence interval (CI) was calculated using the exact method.

**Table 2. Relative sensitivity and specificity of the Zenit anti-GBM kit compared to GBM IFA.**

A total of 68 frozen retrospective sera were assayed. The following table summarises the results.

<b>Zenit anti-GBM</b>				
<b>GBM IFA</b>	<b>Positive</b>	<b>Equivocal</b>	<b>Negative</b>	<b>Total</b>
Positive	55	3	0	58
Negative	1	1	8	10
<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>68</b>

Sera falling in the equivocal range were excluded from the following calculations.

Relative sensitivity	= 55/55 = 100 %	95% CI = 93.5-100 %
Relative specificity	= 8/9 = 88.9 %	95% CI = 51.8-99.7 %
Relative accuracy	= 63/64 = 98.4%	95% CI = 91.6-100 %

**Table 3. Relative sensitivity and specificity of the Zenit anti-GBM kit compared to an alternative ELISA.**

(Zenit 60x60x60) A total of 159 frozen retrospective sera were assayed. The following table summarises the results.

<b>Zenit anti-GBM</b>					
		<b>Positive</b>	<b>Equivocal</b>	<b>Negative</b>	<b>Total</b>
<b>Alternative ELISA</b>	<b>Positive</b>	35	0	0	35
	<b>Equivocal</b>	3	1	0	4
	<b>Negative</b>	0	1	119	120
	<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>2</b>	<b>119</b>	<b>159</b>

Sera falling in the equivocal range were excluded from the following calculations.

Relative sensitivity	= 35/35 = 100 %	95% CI = 90.0-100 %
Relative specificity	= 119/120 = 99.2 %	95% CI = 95.4-100 %
Relative accuracy	= 154/155 = 99.4%	95% CI = 96.5-100 %

The 95% confidence interval (CI) was calculated using the exact method.

**Table 4. Batch to batch variation** was determined by testing four different samples in duplicate. Results were obtained for four different batches.

<b>Sample</b>	<b>Mean value</b>	<b>SD</b>	<b>CV %</b>
1	58 U/ml	5	9
2	45 U/ml	7	15
3	24 U/ml	2	9
PK	40 U/ml	5	11

**Table 5. Inter-assay precision** was determined by testing two different samples in duplicate. Results were obtained for seven different runs.

Sample	Mean value	SD	CV %
1	40 U/ml	2.6	7
2	18 U/ml	1.9	11

**Table 6. Intra-assay precision** was determined by testing one samples in 70 wells.

Sample	Mean value	SD	CV %
1	67 U/ml	5.4	8

**Table 7. Linearity.** The values were determined for serial two-fold dilutions of four positive sera. The values were compared to log 2 of dilution by standard linear regression. The data indicates that the assay has a linear relationship with serum dilution.

Serum	neat	1:2	1:4	1:8	1:16	r
1	60	36	18	9		0,977
2	217	126	82	71	26	0,988
3	98	60	34	23	6	0,998
4	69	42	19	12		0.999

## Troubleshooting

<b>Problem:</b>	<b>Possible causes:</b>	<b>Solution:</b>
Control values out of range.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Incorrect temperature, timing or pipetting; reagents not mixed.</li> <li>2. Cross contamination of controls.</li> <li>3. Improper dilution.</li> <li>4. Optical pathway not clean.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Check that the time and temperature was correct. See "Poor precision" below. Repeat test.</li> <li>2. Pipette carefully.</li> <li>3. Repeat test.</li> <li>4. Check for dirt or air bubbles in the wells. Wipe bottom and reread.</li> </ol>
All test results negative.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. One or more reagents not added, or added in wrong sequence.</li> <li>2. Antigen coated plate inactive.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Recheck procedure. Check for unused reagents. Repeat test.</li> <li>2. Check for obvious moisture in unused wells. Wipe bottom and reread.</li> </ol>
All test results yellow.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Contaminated buffers or reagents.</li> <li>2. Washing solution contaminated</li> <li>3. Improper dilution of serum.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Check all solutions for turbidity.</li> <li>2. Use clean container. Check quality of water used to prepare solution.</li> <li>3. Repeat test.</li> </ol>
Poor precision.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pipette delivery CV greater than 5%</li> <li>2. Serum or reagents not mixed sufficiently or not equilibrated to room temperature.</li> <li>3. Reagent addition taking too long; inconsistency in timing intervals.</li> <li>4. Optical pathway not clean.</li> <li>5. Washing not consistent; trapped bubbles; washing solution left in the wells</li> <li>6. Improper pipetting.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Check calibration of pipette. Use reproducible technique.</li> <li>2. Mix all reagents gently but thoroughly and equilibrate to room temperature.</li> <li>3. Develop consistent uniform technique and use multi-tip device or auto dispenser to decrease time.</li> <li>4. Check for air bubbles in the wells. Wipe bottom and reread.</li> <li>5. Check that all wells are filled and aspirated uniformly. Dispense liquid above level of reagent in well. After the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue.</li> <li>6. Avoid air bubbles in pipette tips.</li> </ol>



## **TROUSSE POUR LA DÉTECTION QUALITATIVE ET LA DÉTERMINATION SEMI-QUANTITATIVE PAR DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE (ELISA) DES ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE LA CHAÎNE $\alpha$ 3 DU COLLAGÈNE TYPE IV (ANTIGÈNE GOODPASTURE) DANS LE SÉRUM HUMAIN**

### **INTRODUCTION**

CETTE TROUSSE EST UTILISÉE POUR LE DIAGNOSTIC *IN VITRO*

La trousse Zenit anti-GBM antibodies utilise une méthode immuno-enzymatique (ELISA) pour la détection et la détermination semi-quantitative des anticorps IgG anti-membrane basale glomérulaire (GBM) dans le sérum humain.

Le dosage permet de détecter les anticorps dans un seul échantillon sérique. Les résultats du dosage sont utilisés comme aide au diagnostic du syndrome de Goodpasture.

### **Résumé et commentaires**

Le syndrome de Goodpasture est caractérisé par une hémorragie pulmonaire, une atteinte rénale et la présence d'anticorps anti-GBM. Le diagnostic repose sur des signes cliniques d'hémoptysie et d'une glomérulonéphrite rapidement progressive, combinés à la présence d'anticorps anti-GBM.

Puisqu'il existe d'autres maladies auto-immunes graves pouvant présenter des symptômes similaires, cette trousse est utile pour différencier entre ces différentes maladies.

Moins d'un tiers de patients atteints de syndromes pneumo-rénaux ont des anticorps anti-antigène Goodpasture, la majorité possèdent soit protéinase 3-ANCA soit Myéloperoxydase-ANCA.

L'immunofluorescence indirecte a été utilisée dans le passé pour détecter les anticorps anti-GBM.

Lorsque le premier test ELISA basé sur une digestion à la collagénase fut publié en 1981, les dosages utilisant des extraits bruts sont devenus la seule méthode alternative. En 1984, on a montré que l'antigène spécifique provient du domaine C-terminal de la chaîne  $\alpha$ 3 du collagène IV et des dosages sensibles et spécifiques ont été ensuite développés. La nature moléculaire de l'antigène Goodpasture a été réexaminée par Hudson BG et coll. et par Hellmark T et coll.. L'antigène est caractérisé par une distribution tissulaire limitée qui apparaît principalement dans les reins et les poumons.

La sensibilité et la spécificité des tests ELISA pour détecter les anticorps anti-GBM sont élevées. Des réactions faussement positives ont lieu surtout dans le lupus érythémateux disséminé (LED) et dans d'autres maladies avec activation polyclonale, dont la plupart donnent des titres inférieurs à 10-20 U/ml.

### **Description de la méthode**

Cette trousse utilise une technique ELISA basée sur l'utilisation de plaques de microtitration avec des puits revêtus d'antigène GBM purifié. Le sérum à doser est dilué au 1/80 et mis à incuber dans les puits de la microplaque. Lors de cette étape, les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes des puits. Les anticorps non fixés et autres éléments sont éliminés par lavage. Ensuite, des immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines conjuguées à la phosphatase alcaline sont ajoutées. Lors de l'incubation, le conjugué se lie au complexe antigène-anticorps fixé au puits. Après un nouveau lavage, la détection des anticorps spécifiques est obtenue par incubation avec la solution de substrat. La quantité d'anticorps liés est proportionnelle à l'intensité de la coloration qui est mesurée en termes d'absorbance (densité optique = D.O.). L'absorbance est alors calculée par rapport à la courbe d'étalonnage et les résultats sont donnés en U/ml arbi.

### **Prélèvement des échantillons**

Le test est à utiliser avec des échantillons sériques. Manipuler comme s'ils étaient capables de transmettre des agents infectieux.

Eviter d'utiliser du sérum ictérique, lipémique ou hémolysé. Le sérum inactivé par la chaleur peut donner des réactivités non spécifiques et ne devrait pas être utilisé.

Conserver le sérum à 2-8°C si le dosage doit être réalisé dans les cinq jours. Pour des plus longues périodes, conserver le sérum à -20°C ou à une température inférieure.

Ne pas utiliser de congélateurs à décongélation automatique, qui peuvent faire subir à l'échantillon des cycles de congélation-décongélation dégradant l'anticorps. Les échantillons qui ont été conservés de façon inadéquate ou qui ont subi des cycles de congélation-décongélation peuvent donner des résultats faux.

### Précautions d'emploi

Réactifs contenant des substances d'origine humaine

Produit potentiellement infectieux.

Toutes les U/ml de sérum et de plasma utilisées pour la fabrication des composants de cette trousse ont été analysées et ont été trouvées négatives en Ag HBS, en anticorps anti-VHC et en anticorps anti-VIH 1/2. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution.

Toutes les solutions contiennent du ProClin 300 comme conservateur. Ne jamais pipeter avec la bouche et ne pas laisser les réactifs ou les échantillons de patient entrer en contact avec la peau. Les réactifs contenant du ProClin 300 peuvent être irritants. Éviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, laver avec une grande quantité d'eau.

Les concentrations d'anti-GBM dans un échantillon donné, déterminées par des trousse provenant de différents fabricants, peuvent varier en raison des différences dans les méthodes de dosage et de la spécificité du réactif.

### Précautions supplémentaires

Toutes les solutions contiennent du ProClin 300 comme conservateur. Ne jamais pipeter avec la bouche et ne pas laisser les réactifs ou les échantillons de patient entrer en contact avec la peau. Les réactifs contenant du ProClin 300 peuvent être irritants. Éviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, laver avec une grande quantité d'eau.

Les concentrations d'anti-GBM dans un échantillon donné, déterminées par des trousse provenant de différents fabricants, peuvent varier en raison des différences dans les méthodes de dosage et de la spécificité du réactif.

### Matériel nécessaire mais non fourni

Micropipettes de précision avec embouts jetables.

Récipients propres en plastique ou en verre pour la dilution du tampon de lavage et des sérums de patients.

Dispositif de lavage des microplaques, papier absorbant, tubes et minuterie.

Lecteur de plaque avec filtre à 405 nm.

### Réactifs

N° de référence GP 104X : trousse pour 96 déterminations.

Dès réception, conserver tous les réactifs entre 2 et 8°C.

**Microplaques revêtues.** Une plaque de 96 puits (12 x 8), revêtus d'anti-membrane basale glomérulaire (GBM) d'origine bovine purifiée et un couvercle hermétique, conditionnés dans un sachet d'aluminium contenant un déshydratant.

**Tampon diluant (couleur rougeâtre).** Un flacon de 32 ml contenant une solution tamponnée PBS, prête à l'emploi, avec 0,05 % de ProClin 300 comme conservateur.

**Contrôle négatif (couleur verte).** Un flacon de 1,5 ml, contenant du sérum humain négatif pour les IgG anti-GBM dans le tampon diluant. Prêt à l'emploi.

**Contrôle positif (couleur rouge).** Un flacon de 1,5 ml, contenant du sérum humain positif pour les IgG anti-GBM dans le tampon diluant. Prêt à l'emploi.

**Conjugué (couleur bleue).** Un flacon de 13 ml contenant des immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines purifiées, conjuguées à de la phosphatase alcaline dans un tampon PBS

- **Un flacon** de 13 mL solution pour comprimés de substrat pNPP.

- **Un flacon** de 30 ml, solution de lavage (30 x concentrée).

**Etalons 1-5 (5 flacons).** Chaque flacon de 1,5 ml contient du sérum humain réactif vis-à-vis des IgG anti-GBM et non réactif vis à vis de l'AghBs et des anticorps anti-VHC et anti-VIH 1 et 2, 0,2 % de sérum albumine bovine et du ProClin 300. Les concentrations des étalons sont : 10, 40, 80, 160, 320 U/ml arbitraires.

### Conservation et stabilité des réactifs

- Tous les réactifs de la trousse sont prêts à l'emploi à l'exception du tampon de lavage et doivent être conservés à 2-8°C.
- Retirer uniquement le nombre de barrettes nécessaire au dosage et refermer soigneusement le sachet d'aluminium.

### Préparation des réactifs

Avant de démarrer la procédure de dosage, tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante pour éviter la condensation. Calculer le nombre de puits nécessaire.

**Microplaque.** Le sachet d'aluminium avec le déshydratant doit être soigneusement rescellé, après avoir retiré les barrettes nécessaires au dosage.

**Solution de lavage.** Diluer 30 ml de solution de lavage concentrée (X30) dans 870 ml d'eau distillée. Conservée à 2-8°C, la solution de lavage diluée est stable jusqu'à la date de péremption de la trousse. Des résultats valides et reproductibles sont obtenus uniquement en suivant strictement la notice d'emploi et en utilisant les réactifs spécifiques de la trousse.

### PROCÉDURE DE DOSAGE

- Couper le sachet d'aluminium et extraire le nombre de barrettes nécessaire (voir « Préparation des réactifs »).
- Diluer le sérum de patient au 1/80 avec le tampon diluant (395 µl de diluant + 5 µl de sérum).
- Distribuer (en doublets) 100 µl de tampon diluant (blanc), de chaque étalon, de contrôle négatif, de contrôle positif et d'échantillon de patient (P), dilué au 1/80 avec le tampon diluant, dans les puits respectifs, selon le tableau de distribution ci-après.

#### Tableau de distribution des réactifs

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Dil	Etal 4	P1									
<b>B</b>	Dil	Etal 4	P1									
<b>C</b>	Etal 1	Etal 5	P2									
<b>D</b>	Etal 1	Etal 5	P2									
<b>E</b>	Etal 2	CN	etc									
<b>F</b>	Etal 2	CN										
<b>G</b>	Etal 3	CP										
<b>H</b>	Etal 3	CP										

- Recouvrir la microplaque et la laisser incuber pendant 30 min à température ambiante (20-25°C).
- Après incubation, laver les puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage par puits, en remplissant et vidant les puits à chaque fois. Après le dernier lavage, tapoter délicatement les barrettes sur du papier absorbant.
- Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits.
- Incuber de nouveau la microplaque, pendant 30 min à température ambiante (20-25°C).
- Après incubation, laver les puits de nouveau (voir ci-dessus).
- Ajouter 100 µl de solution de substrat dans chaque puits et incuber la microplaque, pendant 60 min (± 10 min) à température ambiante (20-25°C).
- Lire l'absorbance sur un lecteur de microplaque à 405 nm.

	Blanc	Contrôle négatif	Contrôle positif	Echantillon dilué au 1/80
Diluant pour échantillons	100 µl	-	-	-
Contrôle négatif	-	100 µl	-	-
Contrôle positif	-	-	100 µl	-
Echantillon	-	-	-	100 µl
Incuber pendant 30 min à T.A., laver 3 fois avec la solution de lavage				
Conjugué	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incuber pendant 30 min à T.A., laver 3 fois avec la solution de lavage				
Substrat	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incuber pendant 60 min ( $\pm$ 10 min) à T.A.				
Lecture photométrique à 405 nm				

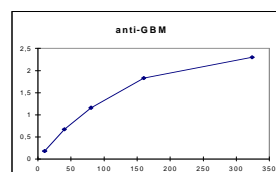
## Calcul des résultats

### Validation

1. Lire les valeurs d'absorbance à 405 nm.
2. Soustraire la valeur D.O. du blanc de toutes les autres valeurs D.O.
3. Dessiner la courbe d'étalonnage en traçant les valeurs de D.O. par rapport aux valeurs en U/ml arbitraires des 5 étalons. On a attribué des valeurs arbitraires à chacun des 5 étalons : 320 U/ml à l'étalon 1, 160 à l'étalon 2, 80 à l'étalon 3, 40 à l'étalon 4 et 10 à l'étalon 5.
4. Lire la concentration de l'échantillon de patient en U/ml arbitraires sur la courbe d'étalonnage. Les valeurs supérieures à 320 U/ml devraient être rapportées comme > 320 U/ml.

Les U/ml arbitraires ont été adoptées par Zenit puisqu'il n'y a pas d'étalon international connu pour exprimer les titres d'anti-GBM.

<u>Exemple:</u>	<u>Étalon</u>	<u>U/mlé</u>	<u>Absorbance</u>
	1	320	2,3
	2	160	1,8
	3	80	1,2
	4	40	0,7
	5	10	0,18



Important: Ces valeurs sont données à titre d'exemple et ne doivent pas être utilisées pour l'interprétation des échantillons de patient.

### Contrôle de qualité

La valeur de D.O. du contrôle négatif doit être inférieure à celle de l'étalon 5.

La valeur de D.O. de l'étalon 1 > 1,0.

La valeur du contrôle positif voir le lot certificat.

Les contrôles négatif et positif sont prévus pour contrôler tout défaut substantiel des réactifs. Le contrôle positif ne garantit pas la précision à la valeur seuil du dosage. Il est conseillé le dosage d'un contrôle supplémentaire à la valeur seuil. Si l'une des valeurs ne donne pas les résultats attendus, le test doit être considéré comme non valide et il doit être refait. Des contrôles supplémentaires peuvent être dosés suivant les exigences de la réglementation.

### Interprétation des résultats

Résultat	Interprétation
$\leq$ 10 U/ml	Négatif
10-20 U/ml	Douteux*
> 20 U/ml	Positif

\* Des échantillons qui ont des valeurs dans la zone grise doivent être dosés de nouveau ; si le résultat du deuxième dosage est douteux, doser de nouveau avec une autre méthode ou alors doser un nouvel échantillon.

### Limites du dosage

Le titre d'anticorps d'un patient ne doit pas être utilisé pour mesurer la gravité de la maladie, puisque des anticorps de différents patients peuvent différer les uns des autres par leur affinité. Par conséquent, il est difficile d'obtenir une standardisation absolue des résultats.

Les décisions thérapeutiques ne devraient pas être prises sur la base unique des résultats du test, ceux-ci doivent être utilisés associés aux symptômes cliniques et aux résultats d'autres tests disponibles.

Des sérums provenant de patients atteints d'autres maladies auto-immunes et de sujets sains peuvent contenir des auto-anticorps pouvant provoquer d'éventuelles réactions croisées. Quelques sujets peuvent être positifs vis-à-vis des anticorps anti-GBM avec peu ou pas de signes cliniques de maladie. D'autre part, quelques patients atteints de maladie active peuvent avoir des concentrations indétectables de ces anticorps.

La thérapie immunosuppressive ne devrait pas être mise en place sur la base d'un résultat anti-GBM positif. Le début ou le changement du traitement ne devrait pas reposer sur le seul changement de concentration des anti-GBM, mais plutôt sur une observation clinique approfondie.

### Résultats attendus

On trouve rarement des anti-GBM chez les sujets sains. La trousse Zenit anti-GBM antibodies a été évaluée sur 120 sérums « normaux ». Les 120 sérums ont donné un résultat négatif. L'indice annuel d'incidence du syndrome de Goodpasture est d'un nouveau cas par million d'habitants.

Des anticorps anti-GBM ont été trouvés dans des sérums de la plupart des patients atteints du syndrome de Goodpasture. La trousse a été évaluée sur 40 sérums provenant de patients atteints du syndrome de Goodpasture, 38 (95 %) ont été trouvés positifs.

### Performances du dosage

#### Spécificité et sensibilité diagnostiques

Une étude rétrospective sur un total de 198 échantillons congelés, cliniquement caractérisés, a été réalisée avec la trousse anti-GBM. Le tableau suivant résume les résultats :

Contrôles et groupes de maladie	N	Négatif (< 10 U/ml)	Douteux (10-20 U/ml)	Positif (> 20 U/ml)
Sujets sains	80	80	0	0
Granulomatose de Wegener (GW)	12	12	0	0
Périatérinite microscopique (PM)	15	15	0	0
Lupus érythémateux disséminé (LED)	19	19	0	0
Autres*	32	32	0	0
Néphrite anti-GBM**	40	0	2	38

\* Autres = polyarthrite rhumatoïde, colite ulcéraire, maladie cœliaque, syndrome de Crohn.

\*\* GBM = glomerular basement membrane = membrane basale glomérulaire

#### Sensibilité diagnostique (les échantillons douteux ont été exclus des calculs)

GBM = 38/38 = 100 %

#### Spécificité diagnostique (les échantillons douteux ont été exclus des calculs)

GW + MP = 27/27 = 100 %      Autres = 32/32 = 100 %

LED = 19/19 = 100 %      Sains = 80/80 = 100 %

**Spécificité et sensibilité relatives de la trousse Zenit anti-GBM** comparée au test GBM IFA. Un total de 68 échantillons congelés a été dosé avec la trousse anti-GBM. Le tableau suivant résume les résultats :

		Zenit anti-GBM			
		Positif	Douteux	Négatif	Total
GBM IFA	Positif	55	3	0	58
	Négatif	1	1	8	10
	Total	56	4	8	68

Les sérums qui ont donné des résultats douteux ont été exclus des calculs.

**Sensibilité relative** = 55/55 = 100 %      **Spécificité relative** = 8/9 = 88,9 %  
**Justesse relative** = 63/64 = 98,4 %

**Spécificité et sensibilité relatives de la trousse Zenit anti-GBM** comparée à une autre trousse ELISA (Zenit 60x60x60)

Un total de 159 échantillons congelés a été dosé avec la trousse anti-GBM. Le tableau suivant résume les résultats :

		Zenit anti-GBM (30'-30'-60)			
		Positif	Douteux	Négatif	Total
Trousse ELISA (Zenit 60'-60'-60')	Positif	35	0	0	35
	Douteux	3	1	0	4
	Négatif	0	1	119	120
	Total	38	2	119	159

Les sérums qui ont donné des résultats douteux ont été exclus des calculs.

**Sensibilité relative** = 35/35 = 100 %      **Spécificité relative** = 119/120 = 99,2 %  
**Justesse relative** = 154/155 = 99,4 %

### Précision intra-essais

La répétabilité ou la précision intra-essais a été déterminée sur un échantillon dosé dans 70 puits au cours de la même série de dosage.

Échantillon	Moyenne (U/ml)	Écart-type	CV %
1	67	5,4	8

### Précision inter-essais

La reproductibilité ou la précision inter-essais a été déterminée sur deux échantillons dosés en doublets au cours de 7 séries de dosage différentes.

Échantillon	Moyenne (U/ml)	Écart-type	CV %
1	40	2,6	7
2	18	1,9	11

### Précision inter-lots

La précision inter-lots a été déterminée sur quatre échantillons dosés en doublets. Les résultats ont été obtenus avec 4 lots différents de trousse.

Échantillon	Moyenne (U/ml)	Écart-type	CV %
1	16	2,9	18
2	42	2,4	6
3	67	2,1	3
PC	134	9,6	7

**Linéarité**

Pour déterminer la linéarité de la dilution, quatre sérums positifs ont été dilués en série au 1/2 puis dosés. Les valeurs ont été comparées au  $\log^2$  de la dilution par régression linéaire standard.

Les résultats obtenus indiquent qu'il existe une relation linéaire entre la valeur obtenue et la dilution.

Sérum	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	r
1	60	36	18	9		0,977
2	217	126	82	71	26	0,988
3	98	60	34	23	6	0,998
4	69	42	19	12		0,999

**CAUSES D'ERREUR**

<b>Problème :</b>	<b>Cause possible :</b>	<b>Solution :</b>
Valeurs des contrôles hors des intervalles	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Distribution des réactifs, temps et température de réaction erronés ; réactifs pas bien mélangés.</li> <li>2. Contamination croisée des contrôles.</li> <li>3. Mauvaise dilution</li> <li>4. Trajet optique sale</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vérifier temps et température d'incubation. Voir « Mauvaise précision » (ci-dessous). Refaire le dosage.</li> <li>2. Pipeter avec soin.</li> <li>3. Refaire le dosage.</li> <li>4. Vérifier la présence de saleté ou de bulles d'air dans les puits. Nettoyer le fond de la plaque et relire.</li> </ol>
Tous les résultats sont négatifs	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Un ou plusieurs réactifs n'ont pas été ajoutés ou ont été ajoutés dans le mauvais ordre.</li> <li>2. Antigène des barrettes revêtues inactif.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vérifier la procédure. Vérifier s'il reste des réactifs. Refaire le dosage.</li> <li>2. Vérifier la présence d'humidité dans les puits non utilisés. Nettoyer le fond de la plaque et relire.</li> </ol>
Tous les puits sont jaunes	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tampons ou réactifs contaminés.</li> <li>2. Solution de lavage contaminée.</li> <li>3. Mauvaise dilution du sérum.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vérifier toutes les solutions pour s'assurer qu'elles ne sont pas troubles.</li> <li>2. Utiliser un récipient propre. Vérifier la qualité de l'eau utilisée pour préparer la solution.</li> <li>3. Refaire le dosage.</li> </ol>
Mauvaise précision	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. CV% de l'appareil à pipeter supérieur à 5% ou échantillons ajoutés trop rapidement.</li> <li>2. Sérum ou réactifs insuffisamment mélangés ou pas portés à température ambiante.</li> <li>3. Ajout de réactifs trop lent ; intervalles de temps non reproductibles.</li> <li>4. Trajet optique sale.</li> <li>5. Lavage non reproductible ; présence de bulles d'air ou de liquide résiduel dans les puits à la fin du lavage.</li> <li>6. Pipetage non reproductible.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vérifier le réglage de l'appareil à pipeter. Utiliser une technique reproductible.</li> <li>2. Mélanger délicatement mais intimement tous les réactifs et les amener à température ambiante.</li> <li>3. Développer une technique reproductible et utiliser des multipettes ou des distributeurs automatiques pour réduire les délais</li> <li>4. Vérifier la présence de bulles d'air dans les puits. Nettoyer le fond de la plaque et relire.</li> <li>5. Vérifier que tous les puits sont uniformément remplis et aspirés. Distribuer la solution de lavage de manière à dépasser le niveau de réactif dans les puits. Après le dernier lavage, vider les puits en tapotant les barrettes sur du papier absorbant.</li> <li>6. Éviter les bulles d'air à l'extrémité des pipettes.</li> </ol>



## ESPAÑOL

### INSTRUCCIONES DE USO - VERSIÓN BREVE

#### USO PREVISTO

El análisis Zenit anti-GBM es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizado para detectar y semicuantificar anticuerpos IgG contra los glomérulos de la membrana basal en suero humano. Los resultados se utilizan como ayuda en el diagnóstico del síndrome de Goodpasture. El análisis debe ser realizado por personal calificado.

PARA USO EN DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

#### Recogida de muestras

El análisis anti-GBM está concebido para muestras de suero. Téngase en cuenta que los diferentes reactivos y sobre todo los sueros pueden tener componentes potencialmente infecciosos. No deben analizarse sueros ictericos, lipémicos o hemolizados. El suero inactivado por calor puede mostrar actividad no específica y por tanto no debe ser analizado. Las muestras se conservan a temperatura entre 2 y 8 °C si los análisis se efectúan en un plazo de 5 días. La conservación a largo plazo debe realizarse a -20 °C o más. Los congeladores con autodescongelación no son apropiados para estos casos debido al riesgo de descongelación de las pruebas. Las pruebas que no han sido debidamente almacenadas pueden arrojar resultados erróneos.

Las normas NCCLS indican cómo almacenar las muestras de sangre (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

#### Advertencias y precauciones

Sólo para uso en diagnóstico *in vitro*

Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de los controles y calibradores de este ensayo se analizó con métodos aprobados por la FDA y resultó negativo en los análisis de detección de anti-VIH 1 y 2, HbsAg y VHC, así como al antígeno de superficie de la hepatitis B. Pese a ello, téngase en cuenta que ningún método puede garantizar la ausencia de VIH, VHC, virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos.

Todas las muestras humanas deben ser consideradas potencialmente infecciosas y manipularse con el cuidado requerido.

El Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) y los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Estados Unidos recomiendan manipular los materiales potencialmente infecciosos en laboratorios de nivel 2 de bioseguridad.

Todas las soluciones contienen Proclin 300 como conservante. No pipetear con la boca. Evítese el contacto directo de la piel con los reactivos o las muestras de pacientes. Los reactivos con Proclin 300 pueden ser irritantes. Por eso es indispensable evitar el contacto con la piel y los ojos. En caso de que un reactivo entre en contacto con la piel o los ojos lavar inmediatamente y con cuidado la zona afectada con gran cantidad de agua.

#### Equipo adicional requerido que no se entrega con este producto:

- Lector de microplacas con filtro para 405 nm.
- Pipeta de precisión con puntas desechables.
- Instalación de lavado para placas de microtiter, papel absorbente, tubos de ensayo y cronómetro.

#### Contenido y conservación

- Una placa con tiras (12x8 pocillos), recubiertas con antígeno GBM con sus respectivas tapas. Todo dentro de una bolsa a prueba de aire, rellena de sustancia deshidratante.
- 1,5 ml control negativo (CN), suero humano prediluido
- 1,5 ml control positivo (CP), suero humano prediluido
- 13 ml conjugado de fosfatasa alcalina y anticuerpos anti-IgG humana (color azul)
- 32 ml diluyente (Dil), contiene PBS (color rojo).

- 13 ml solución sustrato pNPP.
- 30 ml solución de lavado (30x conc)
- cinco calibradores con suero humano diluido: 1,5 ml Cal 1 : 320 U/ml; 1,5 ml Cal 2 : 160 U/ml; 1,5 ml Cal 3 : 80 U/ml; 1,5 ml Cal 4 : 40 U/ml, 1,5 ml Cal 5 : 10 U/ml.

Todos los reactivos, excepto la solución de lavado, están preparados para uso inmediato. Conservar el kit en el refrigerador a temperatura entre 2 y 8 °C . Mantener bien cerrado para evitar la evaporación. Extraer solamente las tiras necesarias para el análisis y conservar las restantes en su bolsa cerrada.

### PROCEDIMIENTO

Todas las soluciones deben estar a temperatura ambiente. Incubar siempre a temperatura ambiente (20-25 °C) y tapando las tiras. Para la incubación rigen los tiempos siguientes: para el suero, 30 minutos; para el conjugado, 30 minutos; para el sustrato, 60 minutos ( $\pm$  10 minutos).

#### Preparación de la solución de lavado

Diluir 10 ml de solución de lavado concentrada 30x en 290 ml de agua destilada. La solución de lavado es utilizable hasta la fecha de vencimiento si se conserva entre 2-8 °C.

#### Dilución del suero y tiempo de Incubación

Diluir la muestra del paciente con 1/80 de diluyente (395µl diluyente +5 µl suero).

Dispensar (en duplicado) 100µl/pocillo de diluyente (como blanco), de calibradores de 1 a 5, CN, CP y la muestra del paciente, como se indica en el siguiente diagrama. Incubar tapado durante 30 minutos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dil	Cal 4	P1									
B	Dil	Cal 4	P1									
C	Cal 1	Cal 5	P2									
D	Cal 1	Cal 5	P2									
E	Cal 2	CN	etc									
F	Cal 2	CN										
G	Cal 3	CP										
H	Cal 3	CP										

#### Después de incubar el suero

Lavar tres veces con 300µl de solución de lavado por pocillo, vaciando y volviendo a llenar los pocillos cada vez. Después del último lavado, vaciar los pocillos sacudiéndolos boca abajo sobre papel absorbente.

#### Añadir conjugado

Añadir 100 µl de conjugado en cada pocillo e incubar por 30 minutos.

#### Después de incubar el conjugado

Lavar como se indicó anteriormente .

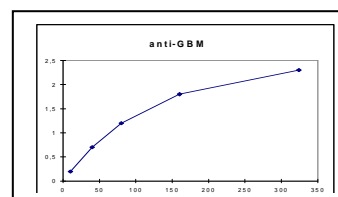
#### Añadir solución sustrato

Añadir 100µl de sustrato pNPP en cada pocillo e incubar durante 60 minutos ( $\pm$  10 minutos). Leer la absorbancia a 405nm con un lector de microplacas.

## Calculación

Restar el valor de densidad óptica (DO) del blanco de los restantes valores de DO. Trazar una curva de calibración, en donde se marquen los valores DO contra los valores de U/ml de los 5 calibradores. A los 5 calibradores se han asignado arbitrariamente los siguientes valores: 320 U/ml al calibrador 1; 160 U/ml al calibrador 2; 80 U/ml al calibrador 3; 40 U/ml al calibrador 4 y 10 U/ml al calibrador 5. Tomar de la curva de valoración los resultados de la muestra de los pacientes. Valores mayores de 320 tienen que ser indicados > 320, alternativamente debe repetirse el análisis con una prueba más diluida. El resultado del análisis Zenit se indica en U/ml arbitrarias, debido a que para la indicación de los títulos GBM no hay un reconocimiento tipo (estándar internacional).

Ejemplo:	Calibrador	U/ml	Absorbancia
	1	320	2,3
	2	160	1,8
	3	80	1,2
	4	40	0,7
	5	10	0,18



**Importante:** La curva que se muestra es sólo un ejemplo y no debe usarse para la lectura de las muestras de los pacientes.

## Control de calidad

La DO del control negativo debe ser inferior a la del calibrador 5.

La DO del calibrador 1 debe ser >1,0.

Consultar los valores de los controles positivo y negativo en el prospecto del lote. Los controles positivo y negativo se utilizan para verificar si los reactivos funcionan correctamente. El control positivo no garantiza precisión ante valores umbral del ensayo. Recomendamos en estos casos efectuar un control adicional. Si uno o más valores están fuera de la escala de valoración indicada, el análisis no tendrá validez y debe ser repetido. Pueden efectuarse controles adicionales de conformidad con las directrices o los requisitos establecidos por las normas locales, regionales o nacionales, o de organizaciones acreditadas. Para una guía de las prácticas adecuadas de control de calidad, véase el documento NCCLS C24-A.

## Interpretación de los Resultados

< 10 U/ml = **negativo**

10-20 U/ml = **dudoso**. Repítase la prueba; si el resultado sigue siendo dudoso, analícese con un método alternativo o bien analícese una nueva muestra.

>20 U/ml = **positivo**

## Limitaciones del Análisis

El título individual de anticuerpos del paciente no puede ser utilizado para dictaminar la gravedad de la enfermedad, debido a que los anticuerpos de diferentes pacientes presentan diferentes afinidades. Por esta razón, el análisis es difícil de tipificar.

Los resultados de este análisis por sí solos no son suficientes para un dictamen clínico, sino que se han de valorar conjuntamente con los datos clínicos (síntomas, etc.) y los resultados de otros análisis disponibles. En el suero de pacientes con otras enfermedades autoinmunes, así como de individuos sanos, puede haber autoanticuerpos capaces de provocar reacciones cruzadas. Un individuo puede reaccionar positivamente a los anti-GBM sin que haya pruebas clínicas para señalar una enfermedad; al mismo tiempo, pacientes que padecen la enfermedad pueden reaccionar en forma negativa con anticuerpos anti-GBM. Un tratamiento de inmunosupresión no debe comenzarse motivado por un resultado positivo anti-GBM, así como no debe iniciarse o modificarse tampoco sólo por cambios en la concentración de anti-GBM, sino que debe basarse en el cuadro clínico general. La concentración anti-GBM de un suero específico puede variar después del análisis con diferentes métodos de pruebas. Esto se debe a las diferentes características y sensibilidad de los reactivos que provienen de diferentes kits y diferentes fabricantes.

## **GEBRAUCHSANWEISUNG IN DEUTSCHER KURZFASSUNG**

### **Verwendungszweck**

Der Testkit Zenit Anti-GBM ist ein enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM) in Humanserum. Die Testergebnisse dienen als Hilfsmittel bei der Diagnose von Goodpasture-Syndrom. Die Analyse sollte von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

NUR FÜR DIE IN-VITRO-DIAGNOSTIK BESTIMMT.

### **Probenentnahme**

Der Anti-GBM-Test ist für Serumproben bestimmt. Behandeln Sie die Proben als potentiell infektiös. Analysieren Sie keine ikterischen, lipämischen oder hämolysierten Proben. Wärmeinaktiviertes Serum kann unspezifische Aktivität zeigen und sollte daher nicht verwendet werden. Proben können bei 2-8 °C aufbewahrt werden, wenn die Analyse innerhalb von 5 Tagen erfolgt. Eine langfristige Aufbewahrung sollte bei - 20°C oder darunter erfolgen. Lagern Sie die Proben nicht in Gefrierschränken mit automatischer Abtaueinrichtung, da dies zum wiederholten Auftauen und Einfrieren der Proben und damit zur Degradation der Antikörper führen kann. Proben, die nicht ordnungsgemäß gelagert wurden, können falsche Ergebnisse hervorrufen.

Das NCCLS hat Richtlinien für die Lagerung von Blutproben herausgegeben (Approved Standard Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

### **Sicherheitsinformation**

Nur für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.

Das für die Zubereitung der Kontrollseren und Kalibratoren des Kits verwendete Humanserum wurde mit von der FDA genehmigten Methoden auf Antikörper gegen das menschliche Immunschwächevirus 1 & 2 (HIV 1&2), Hepatitis C (HCV) sowie Hepatitis-B-Oberflächenantigen getestet und für negativ befunden. Da jedoch keine Methode die Abwesenheit von HIV, HCV, Hepatitis-B-Virus oder anderen Krankheitserregern vollständig garantieren kann, sind Proben und auf Humanserum basierende Reagenzien

als potentiell infektiös zu betrachten und entsprechend zu handhaben.

Die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) und die National Institutes of Health (NIH) empfehlen, potentiell infektiöse Materialien gemäß der Sicherheitsstufe 2 zu behandeln.

Alle Lösungen enthalten Proclin 300 als Konservierungsmittel. Pipettieren Sie niemals mit dem Mund. Lassen Sie Reagenzien oder Patientenproben nicht mit der Haut in Berührung kommen. Reagenzien mit Proclin 300 wirken reizend. Vermeiden Sie den Kontakt mit der Haut und den Augen. Spülen Sie bei Kontakt mit der Haut oder den Augen die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser ab.

### **Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien**

- Mikrotiterplattenreader mit Filter für 405 nm.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen
- Waschanlage für Mikrotiterplatten, saugfähiges Papier, Reagenzgläser, Zeitschaltuhr

### Kitbestandteile und Lagerung der Reagenzien

- Ein Rahmen mit Streifen (12x8), mit GBM-Antigen beschichtet, und ein Deckel in einer verschlossenen Folienpackung mit Trockenmittel .
- 1,5 ml negatives Kontrollserum (NC), enthält Humanserum in Verdünnungsmittel
- 1,5 ml positives Kontrollserum (PC), enthält Humanserum in Verdünnungsmittel
- 13 ml Konjugat, enthält mit alkalischer Phosphatase markierte Anti-IgG-Antikörper (blaue Farbe)
- 32 ml Verdünnungsmittel (Dil), enthält PBS (rote Farbe).
- 13 ml pNPP-Substrat
- 30 ml Waschlösung (30-fach konzentriert)
- Fünf Kalibratoren, enthalten Humanserum in Verdünnungsmittel. 1,5 ml Cal 1 = 320 E/ml, 1,5 ml Cal 2 = 160 E/ml, 1,5 ml Cal 3 = 80 E/ml, 1,5 ml Cal 4 = 40 E/ml, 1,5 ml Cal 5 = 10 E/ml

Alle Reagenzien des Kits, mit Ausnahme der Waschlösung, sind gebrauchsfertig und sind bei 2-8 °C aufzubewahren. Entnehmen Sie nur die für den Test benötigte Anzahl an Streifen und verschließen Sie den Aluminiumbeutel sorgfältig wieder.

### TESTVERFAHREN

Alle Lösungen müssen bei der Anwendung Raumtemperatur haben. Führen Sie in allen Schritten die Inkubation bei Raumtemperatur (20-25 °C) durch; verwenden Sie dabei einen Deckel. Für die Inkubation gelten folgende Zeiten: Serum 30 Minuten, Konjugat 30 Minuten, Substrat 60 Minuten ( $\pm$  10 Minuten)

### Zubereitung der Waschlösung

Verdünnen Sie 10 ml der 30-fach konzentrierten Waschlösung mit 290 ml destilliertem Wasser. Die verdünnte Waschlösung ist bei Aufbewahrung bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar.

### Probeverdünnung und Inkubation

Verdünnen Sie die Patientenproben 1/80 mit dem Verdünnungsmittel (395  $\mu$ l Verdünnungsmittel + 5  $\mu$ l Serum).

Pipettieren Sie das Verdünnungsmittel (als Leerprobe), die Kalibratoren 1, 2, 3, 4, 5, das NC, das PC und die verdünnten Patientenproben (P) in zweifacher Ausführung wie nachfolgend angezeigt (100  $\mu$ l pro Vertiefung). Inkubieren Sie 30 Minuten lang.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dil	Cal 4	P1									
B	Dil	Cal 4	P1									
C	Cal 1	Cal 5	P2									
D	Cal 1	Cal 5	P2									
E	Cal 2	NC	etc.									
F	Cal 2	NC										
G	Cal 3	PC										
H	Cal 3	PC										

### Nach der Seruminkubation

Waschen Sie 3-mal mit 300  $\mu$ l Waschlösung pro Vertiefung; füllen und entleeren Sie dabei jedes Mal die Vertiefungen. Entfernen Sie nach dem letzten Waschschrift die verbleibende Flüssigkeit durch Abklopfen der Streifen über saugfähigem Papier.

### Zugabe des Konjugates

Geben Sie 100  $\mu$ l Konjugat in jede Vertiefung. Inkubieren Sie 30 Minuten lang.

### Nach der Konjugatinkubation

Waschen Sie wie oben angegeben.

## Hinzufügen der Substratlösung

Geben Sie 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung. Inkubieren Sie 60 Minuten ( $\pm$  10 Minuten) lang. Messen Sie die Absorption mit einem Mikrotiterplattenreader bei 405 nm.

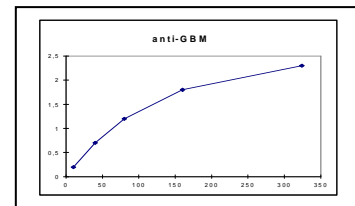
## Auswertung

Ziehen Sie jeweils den OD-Wert der Leerprobe von den übrigen OD-Werten ab.

Zeichnen Sie eine Kalibrierungskurve, indem Sie die OD-Werte gegen die E/ml der 5 Kalibratoren auftragen. Den 5 Kalibratoren wurden die folgenden willkürlichen Werte zugeordnet: Kalibrator 1: 320 E/ml, Kalibrator 2: 160 E/ml, Kalibrator 3: 80 E/ml, Kalibrator 4: 40 E/ml, Kalibrator 5: 10 E/ml. Lesen Sie den Wert der Patientenprobe in E/ml von der so erstellten Kurve ab. Geben Sie Werte über 320 als >320 an oder wiederholen Sie den Test mit einer höheren Verdünnung.

Das Testergebnis wird von Zenit in willkürlichen E/ml angegeben, da es für die Angabe von Anti-GBM-Titern keinen international anerkannten Standard gibt.

<u>Beispiel:</u>	<u>Kalibrator</u>	<u>E/ml</u>	<u>Absorption</u>
	1	320	2,3
	2	160	1,8
	3	80	1,2
	4	40	0,7
	5	10	0,18



**Wichtig:** Die gezeigte Kurve ist nur ein Beispiel und darf nicht für die Auswertung von Patientenproben verwendet werden.

## Qualitätskontrolle

Die OD des negativen Kontrollserums sollte unter der des Kalibrators 5 liegen.

Die OD von Kalibrator 1 sollte >1,0 sein.

Entnehmen Sie die Werte für die positiven und negativen Kontrollseren dem Charginzertifikat.

Positive und negative Kontrollseren dienen der Überwachung auf wesentliche Funktionsfehler der Reagenzien. Das positive Kontrollserum garantiert keine Genauigkeit am Grenzwert des Tests. Es wird empfohlen, am Grenzwert des Tests eine zusätzliche Kontrolle durchzuführen.

Falls einer oder mehrere Werte nicht innerhalb der angegebenen Größenordnung liegen, sollte der Test als ungültig betrachtet und die Analyse wiederholt werden. Sollte es erforderlich sein, können weitere Kontrollseren getestet werden. Empfehlungen zur Qualitätskontrolle können dem NCCLS-Dokument C24-A entnommen werden.

## Auswertung der Ergebnisse

< 10 E/ml = **negativ**

10-20 E/ml = **nicht eindeutig**. Wiederholen Sie den Test; ist der Wiederholungstest ebenfalls nicht eindeutig, verwenden Sie ein alternatives Nachweisverfahren oder eine neue Probe.

>20 E/ml = **positiv**

## Einschränkungen

Der Antikörpertiter eines einzelnen Patienten kann nicht für die Beurteilung des Schweregrades der Krankheit verwendet werden, da die Antikörper unterschiedlicher Patienten unterschiedliche Affinitäten aufweisen können. Es ist daher schwer, eine absolute Standardisierung der Ergebnisse zu erreichen. Der Test sollte nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen zur klinischen Behandlung verwendet werden; er dient vielmehr als Ergänzung zu den klinischen Symptomen und den Ergebnissen anderer verfügbarer Tests.

Seren von Patienten mit anderen Autoimmunkrankheiten und von gesunden Personen können potentiell kreuzreaktive Antikörper enthalten. Einige Personen können ein positives Ergebnis für Anti-GBM-Antikörper aufweisen, obwohl keine oder nur geringe Anzeichen einer klinischen Erkrankung vorliegen. Andererseits kann bei einigen Patienten mit aktiver Erkrankung die Konzentration dieser Antikörper unter der Nachweisgrenze liegen.

Eine Behandlung mit Immunsuppressiva darf nicht nur aufgrund eines positiven Anti-GBM-Ergebnisses begonnen werden. Der Beginn oder die Änderung einer Behandlung dürfen nicht nur aufgrund von Veränderungen der Anti-GBM-Titer erfolgen, sondern erfordern eine sorgfältige klinische Bewertung.



## ITALIANO

### ISTRUZIONI PER L'USO – VERSIONE BREVE

#### Uso previsto

Il kit Zenit anti-GBM utilizza un metodo immunoenzimatico (ELISA) per l'individuazione e la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi IgG anti-membrana basale glomerulare (GMB) nel siero umano. Il dosaggio permette di individuare gli anticorpi in un singolo campione di siero. I risultati possono essere di aiuto nella diagnosi della sindrome di Goodpasture. Le analisi devono essere eseguite da laboratori professionali specializzati.

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

#### Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro.

I componenti del siero umano usati per la preparazione dei controlli e dei calibratori compresi nel kit sono stati testati, mediante metodi approvati dalla FDA, per individuare la presenza di anticorpi al virus 1 & 2 dell'immunodeficienza umana (HIV 1&2), nonché dell'antigene superficiale dell'epatite C (HCV), e sono risultati negativi. Poiché nessun metodo di prova può offrire garanzie complete sull'assenza dei virus HIV, HCV, dell'epatite B o di altri agenti infettivi, i campioni e i reagenti a base umana devono essere trattati come potenziali veicoli di malattie infettive.

Gli organismi sanitari statunitensi Centers for Disease Control and Prevention e National Institutes of Health hanno raccomandato che il materiale potenzialmente infettivo sia maneggiato a livello di biosicurezza 2.

Tutte le soluzioni contengono Proclin 300 come conservante. Non pipettare mai con la bocca ed evitare che i reagenti o il campione del paziente entrino in contatto con gli occhi o con la pelle. I reagenti contenenti Proclin possono essere irritanti. In caso di contatto lavare subito abbondantemente con acqua.

La concentrazione di anti-GBM in un dato campione stabilita con test di produttori diversi può variare a causa delle differenze nei metodi di prova e della specificità dei reagenti.

#### Raccolta dei campioni

Il test anti-GBM si usa con il siero. Manipolare i campioni come potenzialmente infetti.

Evitare di usare campioni itterici, lipemici od emolizzati.

I sieri inattivati tramite calore possono produrre reattività aspecifiche e non devono essere usati.

Conservare il siero tra 2-8°C se il test viene eseguito entro cinque giorni. Se i campioni devono essere conservati più a lungo, mantenerli ad una temperatura di -20°C o inferiore; non usare congelatori con sbrinatori automatici, in quanto esiste il rischio che durante lo sbrinamento i campioni si scongelino e degradino gli anticorpi. I campioni conservati in modo inappropriato o sottoposti a sbrinamenti ripetuti possono produrre risultati errati.

La NCCLS ha stabilito le norme per la corretta conservazione dei campioni di sangue (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

#### Componenti del kit e conservazione dei reagenti

- Un supporto con strips (12x8) rivestite di antigene GBM (catena alfa 3), il tutto sigillato in una busta di alluminio con essiccante.
- 1,5 ml di controllo negativo (NC) contenente siero umano in diluente.
- 1,5 ml di controllo positivo (PC) contenente siero umano in diluente.
- 13 ml di coniugato contenente anticorpi anti-IgG umana e fosfatasi alcalina (colore blu)
- 32 ml di diluente (Dil) contenente PBS (colore rosso).
- 13 ml di substrato pNPP
- 30 ml soluzione di lavaggio concentrata 30x .

- Cinque calibratori contenenti siero umano in diluente. 1,5 ml Cal 1 = 320 U/ml, 1,5 ml Cal 2 = 160 U/ml, 1,5 ml Cal 3 = 80 U/ml, 1,5 ml Cal 4 = 40 U/ml, 1,5 ml Cal 5 = 10 U/ml.

Tutti i reagenti del kit sono già pronti per l'uso, esclusa la soluzione di lavaggio, e devono essere conservati a 2-8°C. Utilizzare solo le strips necessarie al test. Rimettere le strips rimanenti nel sacchetto protettivo con l'essiccante e chiudere accuratamente.

### Materiali o accessori necessari ma non inclusi nel kit

- Lettore di micropiastre con filtro da 405 nm.
- Pipette di precisione con puntali monouso.
- Attrezzatura per il lavaggio dei pozzetti, carta assorbente, provette e timer.

### PROCEDURA

Tutte le soluzioni devono essere usate a temperatura ambiente.

Incubare sempre a temperatura ambiente (20-25°C) con coperchio. Incubare il siero per 30 minuti, il coniugato per 30 minuti e il substrato per 60 minuti ( $\pm$  10 minuti).

### Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire 10 ml della soluzione di lavaggio concentrata 30x in 290 ml di acqua distillata. Se conservata a 2-8°C, la soluzione di lavaggio diluita è stabile fino alla data di scadenza del kit.

### Diluzione del siero e incubazione.

Diluire il siero del paziente 1/80 con diluente (395  $\mu$ l di diluente +5  $\mu$ l di siero).

Pipettare 100 $\mu$ l/pozzetto in doppio diluente (come bianco campione), calibratori 1, 2, 3, 4, 5, NC, PC e siero diluito del paziente (P) come da diagramma seguente. Incubare per 30 minuti.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dil	Cal 4	P1									
B	Dil	Cal 4	P1									
C	Cal 1	Cal 5	P2									
D	Cal 1	Cal 5	P2									
E	Cal 2	NC	etc									
F	Cal 2	NC										
G	Cal 3	PC										
H	Cal 3	PC										

### Dopo l'incubazione dei campioni

Lavare ogni pozzetto 3 volte con 300  $\mu$ l della soluzione di lavaggio, riempiendo e svuotando i pozzetti ogni volta; dopo l'ultimo lavaggio svuotare i pozzetti battendo delicatamente la strip sulla carta assorbente.

### Aggiunta del coniugato

Aggiungere 100  $\mu$ l di coniugato in ciascun pozzetto. Incubare per 30 minuti.

### Dopo l'incubazione del coniugato

Lavare come sopra.

## Aggiunta della soluzione del substrato

Aggiungere 100 µl della soluzione del substrato pNPP in ogni pozzetto, incubare per 60 minuti ( $\pm$  10 minuti).

Leggere l'assorbanza a 405 nm con un lettore di micropiastre.

## Calcoli

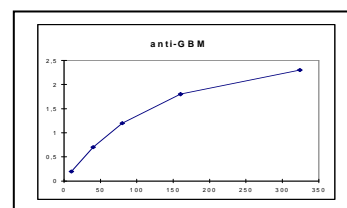
Sottrarre il valore di densità ottica del bianco campione dagli altri valori di densità.

Disegnare una curva di calibrazione con il valore di densità contro i valori U/ml dei 5 calibratori.

Ai 5 calibratori forniti in dotazione nel kit sono stati assegnati valori arbitrari di 320 U/ml per il calibratore 1, 160 U/ml per il calibratore 2, 80 U/ml per il calibratore 3, 40 U/ml per il calibratore 4, e 10 U/ml per il calibratore 5. Leggere il valore U/ml del paziente dal diagramma. I valori superiori a 320 dovranno essere riportati come >320, oppure ripetere il test con una diluzione maggiore.

Zenit ha adottato U/ml arbitrarie, perché non esiste alcuno standard internazionale generalmente riconosciuto per esprimere titoli GBM.

Esempi:	Calibratore	U/ml	Assorbanza
	1	320	2.3
	2	160	1.8
	3	80	1.2
	4	40	0.7
	5	10	0.18



Un campione con un valore di assorbanza di 0,7 verrà letto sull'asse X come avente 40 U/ml di anti-GBM.

**Importante:** il diagramma è solo un esempio e non deve essere usato per l'effettiva interpretazione del paziente.

## Controllo qualità

La densità ottica del controllo negativo deve essere inferiore a quella del calibratore 5.

La densità ottica del calibratore 1 deve essere > 1,0

Per il valore dei controlli positivo e negativo vedi certificato annesso.

I controlli positivo e negativo servono per monitorare l'eventuale malfunzionamento dei reagenti. Il controllo positivo non assicura la precisione dei valori vicini al cut-off. In questo caso raccomandiamo di testare un controllo aggiuntivo a valori vicini al cut-off.

Se i valori non rientrano nei loro rispettivi intervalli, il test non deve considerarsi valido e va quindi ripetuto. Controlli aggiuntivi possono essere testati ai sensi di linee guida o disposizioni di normative locali, statali e/o federali o di organizzazioni accreditate. Si rimanda al NCCLS C 24-A per la guida alle pratiche appropriate di controllo qualità.

## Interpretazione dei risultati

< 10 U/ml = **negativo**

10-20 U/ml = **equivoco**; ripetere il test; se risulta ancora equivoco, ripetere il test con un metodo alternativo o testare un nuovo campione.

> 20 U/ml = **positivo**

## Limitazioni

Il titolo di anticorpi del singolo paziente non può essere utilizzato per misurare la gravità della malattia, in quanto anticorpi provenienti da pazienti diversi possono differire tra loro in affinità. E' quindi difficile ottenere una standardizzazione assoluta dei risultati.

Il test non deve essere considerato come l'unica base per decisioni su terapie cliniche, ma va utilizzato in combinazione con i parametri clinici e con i risultati di altri test disponibili.

Sieri di pazienti con altre malattie autoimmuni e di individui sani possono contenere autoanticorpi potenzialmente cross-reattivi. Alcuni individui possono risultare positivi agli anticorpi anti-GBM anche con scarsa o nessuna evidenza di malattia clinica, mentre alcuni pazienti con patologie attive possono avere livelli anticorpali non rilevabili.

Una terapia immunosoppressiva non deve essere avviata solo sulla base di un risultato anti-GBM positivo. L'inizio di un trattamento o eventuali sue modifiche non devono basarsi solo su variazioni della concentrazione dell'anti-GBM, ma piuttosto su osservazioni cliniche accurate.

## INSTRUÇÕES RESUMIDAS EM PORTUGUÊS

### UTILIZAÇÃO PREVISTA

O kit do teste Zenit anti-GBM (anti-membrana basal glomerular) é um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção e semi-quantificação de anticorpos IgG anti-membrana basal glomerular (MBG) em soros humanos. O ensaio é utilizado para detectar anticorpos apenas numa amostra de soro. Os resultados do ensaio destinam-se a ser utilizados como meio auxiliar no diagnóstico da síndrome de Goodpasture. A análise deve ser realizada por profissionais de laboratório com a formação adequada. PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

### Advertências e precauções

- Para uso em diagnóstico *in vitro*.
- Os componentes de soro humano utilizados na preparação dos controlos e calibradores incluídos no kit foram testados quanto à presença de anticorpos contra os vírus 1 e 2 da imunodeficiência humana (VIH 1 e 2), vírus da hepatite C (VHC), assim como contra o antigénio de superfície da hepatite B por métodos aprovados pela FDA, com resultados negativos. Como não existe nenhum método de teste que ofereça uma garantia total da ausência dos vírus VIH, VHC, da hepatite B ou de outros agentes infecciosos, as amostras e reagentes derivados de produtos humanos devem ser manuseados como materiais capazes de transmitir agentes infecciosos.
- Os Centros para Controlo e Prevenção de Doenças e os Institutos Nacionais de Saúde recomendaram que agentes potencialmente infecciosos sejam manuseados no Nível 2 de Biossegurança.
- Todas as soluções contêm ProClin 300 como conservante. Nunca pipetar com a boca nem permitir que reagentes ou amostras de doentes entrem em contacto com a pele. Os reagentes que contêm ProClin podem ser irritantes. Evitar o contacto com a pele e olhos. Em caso de contacto, lavar abundantemente com água.
- As concentrações de anti-MBG numa dada amostra, determinadas com ensaios de diferentes fabricantes, podem variar devido a diferenças nos métodos de ensaios e especificidade dos reagentes.

### Colheita de amostras

Utilizar o ensaio anti-MBG somente com soro. Manusear como capaz de transmitir agentes infecciosos.

Evitar a utilização de soros ictericos, lipémicos e hemolisados.

Soros inactivados pelo calor podem produzir reactividades inespecíficas e não devem ser utilizados. Conservar o soro entre 2 e 8°C se o teste for realizado num período de cinco dias. Se as amostras tiverem de ser conservadas durante períodos mais longos, conservar a uma temperatura de -20°C ou inferior. Não utilizar congeladores sem formação de gelo porque podem sujeitar as amostras a ciclos de congelação-descongelação e causar a degradação dos anticorpos. Amostras incorrectamente conservadas ou que foram sujeitas a ciclos de congelação-descongelação podem produzir resultados falsos.

A NCCLS (*National Committee on Clinical Laboratory Standards*) oferece recomendações para a conservação de amostras de sangue (Padrões-Procedimentos aprovados para o Manuseamento e Processamento de Amostras de Sangue, H18A, 1990).

### Componentes do kit e conservação de reagentes

- Uma placa com tiras (12 x 8) revestidas com antigénio da MBG (cadeia alfa 3) com uma tampa, acondicionada numa embalagem selada de folha de alumínio com exsiccante.
- 1,5 ml de controlo negativo (NC) contendo soro humano em diluente.
- 1,5 ml de controlo positivo (PC) contendo soro humano em diluente.
- 13 ml de conjugado contendo anticorpos anti-IgG humana marcados com fosfatase alcalina (cor azul).

- 32 ml de diluente (Dil) contendo PBS (cor vermelha).
- 13 ml de substrato pNPP.
- 30 ml de solução de lavagem concentrada 30x
- Cinco calibradores contendo soro humano em diluente. 1,5 ml de Cal 1 = 320 U/ml, 1,5 ml de Cal 2 = 160 U/ml, 1,5 ml de Cal 3 = 80 U/ml, 1,5 ml de Cal 4 = 40 U/ml, 1,5 ml de Cal 5 = 10 U/ml.

Todos os reagentes do kit estão prontos a utilizar com excepção da solução de lavagem e devem ser conservados entre 2 e 8°C.

Remover apenas o número de tiras necessárias para o ensaio, tornando a selar cuidadosamente a embalagem de alumínio.

### **Materiais ou equipamento necessários mas não fornecidos**

- Leitor de microplacas com filtro de 405 nm.
- Pipetas de precisão com pontas descartáveis.
- Máquina de lavar as tiras, papel absorvente, tubos e um temporizador.

### **PROCEDIMENTO**

Todas as soluções devem ser utilizadas à temperatura ambiente. Efectuar a incubação em todas as etapas à temperatura ambiente (20°C - 25°C) com a t ampa. Incubar o soro durante 30 minutos, o conjugado durante 30 minutos e o substrato durante 60 minutos ( $\pm 10$  minutos).

### **Preparação da solução de lavagem**

Diluir 10 ml da solução de lavagem concentrada 30x em 290 ml de água destilada. Quando conservada a 2°C-8°C, a solução de lavagem diluída é estável até ao prazo de validade indicado no kit.

### **Diluição do soro e incubação**

Diluir o soro do doente a 1/80 com diluente (395  $\mu$ l de diluente + 5  $\mu$ l de soro).

Pipetar em duplicado 100  $\mu$ l/poço de diluente (como branco), Calibradores 1, 2, 3, 4, 5, controlo negativo (NC), controlo positivo (PC) e de soro do doente diluído (P) de acordo com o diagrama seguinte. Incubar durante 30 minutos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dil	Cal 4	P1									
B	Dil	Cal 4	P1									
C	Cal 1	Cal 5	P2									
D	Cal 1	Cal 5	P2									
E	Cal 2	NC	etc									
F	Cal 2	NC										
G	Cal 3	PC										
H	Cal 3	PC										

### **Após incubação do soro**

Lavar 3 vezes com 300  $\mu$ l de solução de lavagem/poço, enchendo e esvaziando os poços de cada vez; depois da última lavagem, esvaziar os poços batendo levemente com a tira em papel absorvente.

### **Adição de conjugado**

Adicionar 100  $\mu$ l de conjugado em cada poço. Incubar durante 30 minutos.

## Após incubação do conjugado

Lavar como acima indicado.

## Adição da solução de substrato

Adicionar 100 µl do substrato pNPP em cada poço, incubar durante 60 minutos ( $\pm 10$  minutos).  
Ler a absorbância num comprimento de onda de 405 nm num leitor de microplacas.

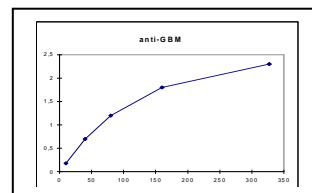
## Cálculos

Subtrair o valor da densidade óptica (DO) do branco dos outros valores de DO.

Traçar uma curva de calibração representando os valores da DO em relação aos valores em U/ml dos 5 calibradores. Foram atribuídos aos cinco calibradores fornecidos os valores arbitrários de 320 U/ml para o calibrador 1, 160 U/ml para o calibrador 2, 80 U/ml para o calibrador 3, 40 U/ml para o calibrador 4 e 10 U/ml para o calibrador 5. Ler o valor em U/ml do doente a partir da curva traçada. Os valores superiores a 320 devem ser comunicados como >320 ou, então, deverão ser novamente analisados com uma diluição mais alta.

A Zenit adoptou um valor arbitrário em U/ml, dado não existir um padrão internacional comprovado para exprimir os títulos de GBM.

Exemplo:	Calibrador	U/ml	Absorbância
	1	320	2,3
	2	160	1,8
	3	80	1,2
	4	40	0,7
	5	10	0,18



Uma amostra com um valor de absorbância de 0,7 é lida no eixo X como tendo 40 U/ml de anti-MBG.

**Importante:** A curva é dada apenas a título de exemplo e não deve ser utilizada para interpretação efectiva de resultados de um doente em particular.

## Controlo de qualidade

A DO do controlo negativo deve ser inferior à do calibrador 5.

A DO do calibrador 1 deve ser > 1,0.

No que respeita ao valor dos controlos positivo e negativo, ver certificado do lote.

Os controlos negativo e positivo destinam-se à monitorização de uma falha importante dos reagentes.

O controlo positivo não assegura a precisão no valor limiar (*cut-off*) do ensaio. Aconselha-se que seja analisado um controlo adicional no valor limiar do ensaio.

Se nenhum dos valores estiver nos intervalos respectivos, o ensaio deve ser considerado como não válido, devendo ser repetido. Podem analisar-se controlos adicionais, de acordo com as directrizes ou exigências dos regulamentos locais e/ou nacionais ou das organizações autorizadas. Consultar o C24-A da NCCLS para orientação sobre as práticas apropriadas de Controlo de Qualidade.

## Interpretação dos resultados

< 10 U/ml = **Negativo**

10-20 U/ml = **Equívoco**: repetir o ensaio; se este der novamente um resultado equívoco, repetir o ensaio por um método alternativo ou analisar nova amostra.

> 20 U/ml = **Positivo**

## Limitações

O título de anticorpos de um doente em particular não pode ser utilizado como medida da gravidade da doença, dado que os anticorpos de doentes diferentes podem diferir uns dos outros no que respeita à afinidade. Portanto, é difícil obter uma normalização absoluta de resultados.

Não se pode depender apenas de ensaios deste tipo como base exclusiva para uma tomada de decisões em terapêutica clínica, no entanto, devem ser utilizados em conjunto com os sintomas clínicos e resultados de outros ensaios disponíveis.

Os soros de doentes com outras doenças auto-imunes e de indivíduos normais podem conter potencialmente auto-anticorpos com reactividade cruzada. Alguns doentes podem ser positivos para anticorpos anti-MBG com pouca ou nenhuma evidência de doença clínica. Por outro lado, alguns doentes com doença activa podem ter níveis não detectáveis destes anticorpos.

Não se deve iniciar uma terapêutica imunossupressora com base num resultado anti-MBG positivo. O início ou as alterações do tratamento não se devem basear apenas em alterações da concentração de anti-MBG, mas também numa observação clínica cuidadosa.



## **Ημιποσοτικό κιτ Zenit a-GBM (Σύνδρομο Goodpasture)**

**Ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων  
έναντι της βασικής μεμβράνης του σπειράματος**

### **ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ**

Το κιτ εξέτασης Zenit anti GBM είναι ένας ενζυμικός προσδιορισμός ανοσοπροσρόφησης (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων IgG έναντι της βασικής μεμβράνης του σπειράματος (GBM) σε ανθρώπινους ορούς. Ο προσδιορισμός χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων σε ένα μονό δείγμα ορού. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού χρησιμοποιούνται ως βοήθημα για τη διάγνωση του συνδρόμου Goodpasture. Η ανάλυση θα πρέπει να εκτελείται από εκπαιδευμένους επαγγελματίες του εργαστηρίου.

ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO

### **Σύνοψη και επεξήγηση**

Το σύνδρομο Goodpasture χαρακτηρίζεται από πνευμονική αιμορραγία, νεφρική ανεπάρκεια και παρουσία αντισωμάτων έναντι της GBM (anti-GBM). Η διάγνωση βασίζεται σε κλινικά σημεία πνευμονικής αιμορραγίας και ταχέως εξελισσόμενης σπειραματονεφρίτιδας σε συνδυασμό με ευρήματα αντισωμάτων έναντι της GBM.

Καθώς υπάρχουν διάφορες άλλες αυτοάνοσες νόσοι που ενδέχεται να παρουσιαστούν με παρόμοια συμπτώματα, αυτό το κιτ είναι ένα χρήσιμο βοήθημα για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ αυτών των νόσων.

Λιγότεροι από το ένα τρίτο των ασθενών με πνευμονονεφρικό σύνδρομο έχουν αντισώματα έναντι του αντιγόνου Goodpasture, ενώ η πλειοψηφία έχει είτε Πρωτεΐνωση 3-ANCA ή Μυελοϋπεροξειδάση-ANCA (1).

Από ιστορικής άποψης, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείτο για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της GBM. Όταν η πρώτη ELISA με βάση μία πέψη κολλαγενάσης δημοσιεύτηκε το 1981 (2), οι προσδιορισμοί που χρησιμοποιούν ακατέργαστα εκχυλίσματα ήταν η μόνη εναλλακτική λύση. Το 1984 το ειδικό αντιγόνο φάνηκε να προέρχεται από την C-τελική περιοχή του κολλαγόνου τύπου IV (αλυσίδα α3) (3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13) και ακολούθως αναπτύχθηκαν ευαίσθητοι και ειδικοί προσδιορισμοί (8). Η μοριακή φύση του αντιγόνου Goodpasture αναθεωρείται σε (9, 14). Το αντιγόνο χαρακτηρίζεται από περιορισμένη ιστική κατανομή που συμβαίνει κυρίως στο νεφρό και τους πνεύμονες (10).

Η ευαισθησία και η ειδικότητα της ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της GBM είναι υψηλή (15). Ψευδώς θετικές αντιδράσεις συμβαίνουν, κυρίως σε SLE και άλλες νόσους με πολυκλωνική ενεργοποίηση, οι περισσότερες από τις οποίες δίνουν χαμηλούς τίτλους 10-20 U/ml.

### **Αρχή του κιτ Zenit anti-GBM**

Οι υποδοχές των ταινιών μικροτιτλοδότησης επικαλύπτονται με καθαμένο αντιγόνο GBM (αλυσίδα α3). Κατά τη διάρκεια της πρώτης επώασης, ειδικά αντισώματα σε αραιωμένο ορό δεσμεύονται στην επικαλυμμένη με αντιγόνο επιφάνεια.

Κατόπιν, πλένονται οι υποδοχές για την αφαίρεση των μη δεσμευμένων αντισωμάτων και άλλων συστατικών.

Ένα συζυγές που περιέχει αντισώματα σε ανθρώπινη IgG σημασμένα με αλκαλική φωσφατάση δεσμεύεται με τα αντισώματα στις υποδοχές σε αυτήν τη δεύτερη επώαση.

Μετά από ένα περαιτέρω βήμα πλύσης, η ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων επιτυγχάνεται με επώαση με διάλυμα υποστρώματος. Η ποσότητα των δεσμευμένων αντισωμάτων σχετίζεται με την ένταση του χρώματος και μετριέται ως απορρόφηση [οπτική πυκνότητα (OD)]. Η απορρόφηση κατόπιν υπολογίζεται έναντι μιας καμπύλης βαθμονομητών και τα αποτελέσματα δίνονται σε αυθαίρετες U/ml.

## Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Για διαγνωστική χρήση in vitro.
- Τα μέρη ανθρώπινου ορού που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των μαρτύρων και βαθμονομητών στο kit έχουν ελεγχθεί για την παρουσία αντισωμάτων στον ιό της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου 1 & 2 (HIV 1&2), τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), καθώς και το επιφανειακό αντιγόνο της ηπατίτιδας B με εγκεκριμένες από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA) μεθόδους και βρέθηκαν αρνητικά. Επειδή καμία μέθοδος εξέτασης δεν μπορεί να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι ο HIV, HCV και ο ιός της ηπατίτιδας B ή άλλοι μολυσματικοί παράγοντες απουσιάζουν, τα δείγματα και τα αντιδραστήρια ανθρώπινης βάσης θα πρέπει να υποβάλλονται σε χειρισμό ως εάν ήταν δυνητικά μετάδοσης λοιμογόνων παραγόντων.
- Τα Κέντρα για τον Έλεγχο και την Πρόληψη Νόσων (Centers for Disease Control and Prevention) των Η.Π.Α. και το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (National Institutes of Health) των Η.Π.Α. συνιστούν ο χειρισμός δυνητικώς λοιμογόνων παραγόντων να γίνεται στο Επίπεδο Βιοασφάλειας 2.
- Όλα τα διαλύματα περιέχουν proclin 300 ως συντηρητικό. Ποτέ μην αναρροφάτε με το στόμα και μην επιτρέπτε στα αντιδραστήρια ή το δείγμα ασθενούς να έρθει σε επαφή με το δέρμα. Αντιδραστήρια που περιέχουν proclin μπορεί να είναι ερεθιστικά. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Σε περίπτωση επαφής, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
- Οι συγκεντρώσεις anti-GBM σε συγκεκριμένο δείγμα που προσδιορίζονται με προσδιορισμούς από διαφορετικούς κατασκευαστές μπορεί να ποικίλλουν λόγω διαφορών στις μεθόδους προσδιορισμού και την ειδικότητα των αντιδραστηρίων.

## Συλλογή δείγματος

- Ο προσδιορισμός anti-GBM προορίζεται για χρήση με ορό. Θα πρέπει να υποβάλλεται σε χειρισμό ως εάν ήταν δυνητικός μετάδοσης λοιμογόνων παραγόντων.
- Αποφύγετε τη χρήση ικτερικών, λιπαιμικών και αιμολυμένων ορών.
- Αδρανοποιημένοι με θερμότητα οροί μπορεί να δώσουν μη ειδικές αντιδραστικότητες και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται.
- Φυλάσσετε τον ορό μεταξύ 2-8° C αν η εξέταση θα γίνει εντός πέντε ημερών. Αν τα δείγματα πρέπει να φυλαχθούν για μεγαλύτερες περιόδους, φυλάξτε σε θερμοκρασία -20° C ή χαμηλότερη. Μη χρησιμοποιείτε καταψύκτη χωρίς πάγο γιατί μπορεί να επιτρέψει στα δείγματα να περάσουν από κύκλους κατάψυξης-απόψυξης και να υποβαθμιστεί το αντίσωμα. Τα δείγματα που φυλάσσονται ακατάλληλα ή υποβάλλονται σε πολλαπλούς κύκλους κατάψυξης-απόψυξης μπορεί να δώσουν ψευδή αποτελέσματα.
- Η Εθνική Επιτροπή Για Κλινικοεργαστηριακά Πρότυπα (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) των Η.Π.Α. παρέχει συστάσεις για την φύλαξη δειγμάτων αίματος (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

## Μέρη του kit και φύλαξη αντιδραστηρίων

- Ένα πλαίσιο με ταινίες (12x8) επικαλυμμένες με αντιγόνο GBM (αλυσίδα α3) με ένα καπάκι σφραγισμένο σε μία συσκευασία αλουμινίου με αποξηραντικό φακελλίσκο.
  - 1,5 mL αρνητικός μάρτυρας (NC) που περιέχει ανθρώπινο ορό σε διαλύτη.
  - 1,5 mL θετικός μάρτυρας (PC) που περιέχει ανθρώπινο ορό σε διαλύτη.
  - 13 mL συζυγές που περιέχει αντισώματα σε ανθρώπινη IgG σημασμένα με αλκαλική φωσφατάση (μπλε χρώματος).
  - 32 ml διαλύτη (Dil) που περιέχουν PBS (ερυθρού χρώματος).
  - 13 ml υποστρώματος pNPP.
  - 30 mL διάλυμα πλύσης με συμπύκνωση 30x.
  - Πέντε βαθμονομητές που περιέχουν ανθρώπινο ορό σε διαλύτη. 1,5 ml Cal 1 = 320 U/ml, 1,5 ml Cal 2 = 160 U/ml, 1,5 ml Cal 3 = 80 U/ml, 1,5 ml Cal 4 = 40 U/ml, 1,5 ml Cal 5 = 10 U/ml.
- Όλα τα αντιδραστήρια στο kit είναι έτοιμα για χρήση εκτός από το διάλυμα πλύσης και θα πρέπει να φυλάσσονται σε 2-8°C.

Αφαιρέστε μόνο τον αριθμό ταινιών που απαιτούνται για την εξέταση και επανασφραγίστε προσεκτικά τη συσκευασία αλουμινίου.

### Υλικά ή εξοπλισμός που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Μονάδα ανάγνωσης μικροπλακών με φίλτρο 405 nm.
- Πιπέτες ακριβείας με αναλώσιμα ρύγχη.
- Σύστημα πλύσης για ταινίες, απορροφητικό χαρτί, σωληνάρια και χρονοδιακόπτης.

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Όλα τα διαλύματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Επνώστε σε όλα τα βήματα σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) με καπάκι. Επνώστε τον ορό για 30 λεπτά, το συζυγές για 30 λεπτά και το υπόστρωμα για 60 λεπτά ( $\pm$  10 λεπτά).

### Προετοιμασία του διαλύματος πλύσης

Αραιώστε 10 mL από το διάλυμα πλύσης με συμπύκνωση 30x σε 290 mL απεσταγμένου νερού. Όταν φυλάσσεται σε 2-8°C, το αραιωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό έως την ημερομηνία λήξης του kit.

### Αραίωση του ορού και επώαση

Αραιώστε τον ορό του ασθενούς 1/80 με διαλύτη (395  $\mu$ l διαλύτη +5  $\mu$ l ορού).

Διανείμετε με πιπέτα 100 $\mu$ l/υποδοχή εις διπλούν διαλύτη (ως τυφλό), Βαθμονομητή 1, 2, 3, 4, 5, NC, PC και αραιωμένο ορό ασθενούς (P) σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα. Επνώστε για 30 λεπτά.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dil	Cal 4	P1									
B	Dil	Cal 4	P1									
C	Cal 1	Cal 5	P2									
D	Cal 1	Cal 5	P2									
E	Cal 2	NC	κ.λ π.									
F	Cal 2	NC										
G	Cal 3	PC										
H	Cal 3	PC										

### Μετά την επώαση ορού

Πλύνετε 3 φορές με διάλυμα πλύσης 300  $\mu$ L / υποδοχή, γεμίζοντας και αδειάζοντας τις υποδοχές κάθε φορά. Μετά την τελευταία πλύση, αδειάστε τις υποδοχές χτυπώντας την ταινία σε απορροφητικό χαρτί.

### Προσθήκη συζυγούς

Προσθέστε 100  $\mu$ L συζυγούς σε κάθε υποδοχή. Επνώστε για 30 λεπτά.

### Μετά την επώαση συζυγούς

Πλύνετε όπως πριν.

### Προσθήκη διαλύματος υποστρώματος

Προσθέστε 100  $\mu$ L υποστρώματος rNPP σε κάθε υποδοχή και επνώστε για 60 λεπτά ( $\pm$  10 λεπτά). Διαβάστε την απορρόφηση σε 405 nm σε μια συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών.

## Υπολογισμοί

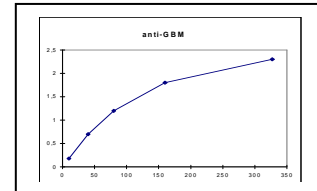
Αφαιρέστε την τιμή OD για το τυφλό από τις άλλες τιμές OD.

Κατασκευάστε μια καμπύλη βαθμονομητών αναπαριστώντας με γραφική παράσταση την OD έναντι των τιμών U/ml των 5 βαθμονομητών. Στους πέντε βαθμονομητές που παρέχονται έχουν αντιστοιχηθεί αυθαίρετα τιμές 320 U/ml για τον βαθμονομητή 1,

160 U/ml για τον βαθμονομητή 2, 80 U/ml για τον βαθμονομητή 3, 40 U/ml για τον βαθμονομητή 4 και 10 U/ml για τον βαθμονομητή 5. Διαβάστε την τιμή U/ml του ασθενούς από την καμπύλη που κατασκευάστηκε. Τιμές μεγαλύτερες από 320 θα πρέπει να αναφέρονται ως >320 ή να υποβάλλονται σε νέο προσδιορισμό με υψηλότερη αραίωση.

Αυθαίρετες U/ml έχουν υιοθετηθεί από την Zenit, λόγω της έλλειψης γενικώς αναγνωρισμένου διεθνούς προτύπου για την έκφραση των τίτλων GBM.

Παράδειγμα: Βαθμονομητής	U/ml	Απορρόφηση
1	320	2,3
2	160	1,8
3	80	1,2
4	40	0,7
5	10	0,18



Ένα δείγμα με τιμή απορρόφησης 0,7 θα διαβαστεί στον άξονα X ως έχον 40 U/ml anti-GBM.

**Σημαντικό:** Η καμπύλη αποτελεί ένα παράδειγμα και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την ερμηνεία πραγματικού ασθενούς.

## Ποιοτικός έλεγχος

Η OD για τον αρνητικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι μικρότερη από εκείνη του βαθμονομητή 5.

Η OD για το βαθμονομητή 1 θα πρέπει να είναι > 1,0.

Για την τιμή θετικών και αρνητικών μαρτύρων, βλ. πιστοποιητικό παρτίδας.

Οι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες προορίζονται για την παρακολούθηση για ουσιαστική αστοχία αντιδραστηρίου. Ο θετικός μάρτυρας δεν διασφαλίζει ακρίβεια στο σημείο αποκοπής του προσδιορισμού. Συνιστάται υποβολή σε προσδιορισμό πρόσθετου μάρτυρα στο σημείο αποκοπής του προσδιορισμού.

Εάν οποιαδήποτε από αυτές τις τιμές δεν βρίσκεται εντός των αντίστοιχων ευρών, η δοκιμασία θα πρέπει να θεωρείται άκυρη και να επαναλαμβάνεται. Ενδέχεται να εξεταστούν πρόσθετοι μάρτυρες σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες ή τις απαιτήσεις των τοπικών, πολιτειακών ή και ομοσπονδιακών κανονισμών ή των οργανισμών πιστοποίησης. Ανατρέξτε στο NCCLS C24-A για καθοδήγηση για τις κατάλληλες πρακτικές QC.

## Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

< 10 U/ml = **Αρνητικό**

10-20 U/ml = **Αμφίβολο**. Επαναλάβετε τη δοκιμασία. Αν το αποτέλεσμα είναι ακόμα αμφίβολο επαναλάβετε τη δοκιμασία με μια εναλλακτική μέθοδο ή με ένα νέο δείγμα.

>20 U/ml = **Θετικό**

## Περιορισμοί

Ο τίτλος αντισωμάτων ενός μεμονωμένου ασθενούς δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο βαρύτητας της νόσου, καθώς τα αντισώματα ενδέχεται να διαφέρουν από ασθενή σε ασθενή ως προς τη συγγένεια. Επομένως, είναι δύσκολο να ληφθεί μια απόλυτη προτυποποίηση των αποτελεσμάτων. Δεν θα πρέπει να στηρίζετε στην εξέταση ως μόνη βάση για τη λήψη αποφάσεων κλινικής θεραπείας, αλλά αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τα κλινικά συμπτώματα και τα αποτελέσματα άλλων διαθέσιμων εξετάσεων.

Οροί από ασθενείς με άλλες αυτοάνοσες νόσους και από φυσιολογικά άτομα ενδέχεται να περιέχουν αυτοαντισώματα δυνητικώς διασταυρούμενης αντίδρασης. Μερικά άτομα ενδέχεται να είναι θετικά για αντισώματα anti-GBM με ελάχιστες ή καθόλου ενδείξεις κλινικής νόσου. Αντίθετα, μερικοί ασθενείς με ενεργή νόσο ενδέχεται να έχουν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα των αντισωμάτων αυτών.

Η ανοσοκατασταλτική θεραπεία δεν θα πρέπει να ξεκινά στη βάση ενός θετικού αποτελέσματος anti-GBM. Η έναρξη ή οι μεταβολές της θεραπείας δεν πρέπει να βασίζονται σε μεταβολές στη συγκέντρωση anti-GBM μόνο, αλλά περισσότερο στην προσεκτική κλινική παρατήρηση.

### Αναμενόμενα αποτελέσματα

Τα Anti-GBM σπάνια απαντώνται σε φυσιολογικά υγιή άτομα. Η δοκιμασία anti-GBM ELISA δοκιμάστηκε με 120 φυσιολογικούς ορούς. 120 βρέθηκαν αρνητικοί. Η ετήσια επίπτωση του συνδρόμου Goodpasture είναι ένας ανά εκατομμύριο κατοίκων το έτος.

Αντισώματα Anti-GBM βρίσκονται στους ορούς των περισσότερων ασθενών με σύνδρομο Goodpasture. Η δοκιμασία anti-GBM ELISA ελέγχθηκε με 40 ορούς GP, 38 εκ των οποίων (95%) βρέθηκαν θετικοί.

### Χαρακτηριστικά απόδοσης

**Πίνακας 1. Κλινική ευαισθησία και ειδικότητα.** Υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό 199 παγωμένοι αναδρομικοί οροί με κλινικό χαρακτηρισμό. Ο ακόλουθος πίνακας συνοψίζει τα αποτελέσματα.

Ομάδες ελέγχου και Νόσου	Συνολικός αριθμός	Αρνητικό <10 U/ml	Αμφίβολο 10-20 U/ml	Θετικό >20 U/ml
Αιμοδότες:	80	80	0	0
WG / MP	27	27	0	0
SLE:	19	19	0	0
Άλλοι:	33	33	0	0
Anti-GBM:	40	0	2	38

WG = Κοκκιωμάτωση Wegener, MP = μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα  
SLE = συστηματικός ερυθματώδης λύκος Άλλα = RA, UC κ.λπ.  
GBM = βασική μεμβράνη του σπειράματος

**Κλινική ευαισθησία** (Τα αμφίβολα δείγματα αποκλείστηκαν από τους υπολογισμούς)

GBM =  $38/38 = 100\%$  95% CI = 90,7-100 %

**Κλινική ειδικότητα** (Τα αμφίβολα δείγματα αποκλείστηκαν από τους υπολογισμούς)

WG/MP =  $27/27 = 100\%$  95% CI = 87,2-100 %

SLE =  $19/19 = 100\%$  95% CI = 82,4-100 %

Άλλα =  $33/33 = 100\%$  95% CI = 89,4-100 %

Δότες =  $80/80 = 100\%$  95% CI = 95,5-100 %

Το διάστημα εμπιστοσύνης (CI) 95% υπολογίστηκε με χρήση της ακριβούς μεθόδου.

### Πίνακας 2. Σχετική ευαισθησία και ειδικότητα του kit Zenit anti-GBM σε σύγκριση με το GBM IFA.

Προσδιορίστηκαν ένα σύνολο 68 παγωμένων αναδρομικών ορών. Ο ακόλουθος πίνακας συνοψίζει τα αποτελέσματα.

<b>Zenit anti-GBM</b>				
<b>GBM IFA</b>	<b>Θετικό</b>	<b>Αμφίβολο</b>	<b>Αρνητικό</b>	<b>Σύνολο</b>
Θετικό	55	3	0	58
Αρνητικό	1	1	8	10
<b>Σύνολο</b>	<b>56</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>68</b>

Οι οροί που εμπίπτουν στο αμφίβολο εύρος αποκλείστηκαν από τους ακόλουθους υπολογισμούς.  
 Σχετική ευαισθησία =  $55/55 = 100\%$  95% CI = 93,5-100 %  
 Σχετική ειδικότητα =  $8/9 = 88,9\%$  95% CI = 51,8-99,7 %  
 Σχετική ακρίβεια =  $63/64 = 98,4\%$  95% CI = 91,6-100 %

### Πίνακας 3. Σχετική ευαισθησία και ειδικότητα του kit Zenit anti-GBM σε σύγκριση με εναλλακτική ELISA.

(Zenit 60x60x60) Προσδιορίστηκαν ένα σύνολο 159 παγωμένων αναδρομικών ορών. Ο ακόλουθος πίνακας συνοψίζει τα αποτελέσματα.

<b>Zenit anti-GBM</b>				
	<b>Θετικό</b>	<b>Αμφίβολο</b>	<b>Αρνητικό</b>	<b>Σύνολο</b>
<b>Θετικό</b>	35	0	0	35
<b>Εναλλακτική ELISA</b>				
<b>Αμφίβολο</b>	3	1	0	4
<b>Αρνητικό</b>	0	1	119	120
<b>Σύνολο</b>	<b>38</b>	<b>2</b>	<b>119</b>	<b>159</b>

Οι οροί που εμπίπτουν στο αμφίβολο εύρος αποκλείστηκαν από τους ακόλουθους υπολογισμούς.  
 Σχετική ευαισθησία =  $35/35 = 100\%$  95% CI = 90,0-100 %  
 Σχετική ειδικότητα =  $119/120 = 99,2\%$  95% CI = 95,4-100 %  
 Σχετική ακρίβεια =  $154/155 = 99,4\%$  95% CI = 96,5-100 %

Το διάστημα εμπιστοσύνης (CI) 95% υπολογίστηκε με χρήση της ακριβούς μεθόδου.

### Πίνακας 4. Η διακύμανση παρτίδας προς παρτίδα προσδιορίστηκε εξετάζοντας τέσσερα διαφορετικά δείγματα εις διπλούν. Ελήφθησαν αποτελέσματα για τέσσερις διαφορετικές παρτίδες.

<b>Δείγμα</b>	<b>Μέση τιμή</b>	<b>TA</b>	<b>ΣΔ(%)</b>
1	58 U/ml	5	9
2	45 U/ml	7	15
3	24 U/ml	2	9
PK	40 U/ml	5	11

### Πίνακας 5. Η ακρίβεια μεταξύ των προσδιορισμών προσδιορίστηκε με την εξέταση δύο διαφορετικών δειγμάτων εις διπλούν. Ελήφθησαν αποτελέσματα για επτά διαφορετικές αναλύσεις.

<b>Δείγμα</b>	<b>Μέση τιμή</b>	<b>TA</b>	<b>ΣΔ(%)</b>
1	40 U/ml	2,6	7
2	18 U/ml	1,9	11

### Πίνακας 6. Η ακρίβεια εντός του ίδιου προσδιορισμού προσδιορίστηκε με την εξέταση ενός δείγματος σε 70 υποδοχές.

<b>Δείγμα</b>	<b>Μέση τιμή</b>	<b>TA</b>	<b>ΣΔ(%)</b>
1	67 U/ml	5,4	8

**Πίνακας 7. Γραμμικότητα.** Οι τιμές προσδιορίστηκαν για σειριακές διπλάσιες αραιώσεις τεσσάρων θετικών ορών. Οι τιμές συγκρίθηκαν με το  $\log 2$  της αραιώσης με τυπική γραμμική παλινδρόμηση. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο προσδιορισμός έχει γραμμική σχέση με την αραιώση του ορού

Ορός	καθαρό	1:2	1:4	1:8	1:16	r
1	60	36	18	9		0,977
2	217	126	82	71	26	0,988
3	98	60	34	23	6	0,998
4	69	42	19	12		0.999

## Επίλυση προβλημάτων











Πρόβλημα:	Πιθανές αιτίες:	Λύση:
Τιμές μάρτυρα εκ εύρους	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Λανθασμένη θερμοκρασία, χρονισμός ή διανομή, μη ανάμιξη αντιδραστηρίων</li> <li>2. Διασταυρούμενη μόλυνση των μαρτύρων</li> <li>3. Ακατάλληλη αραίωση.</li> <li>4 Μη καθαρή οπτική οδός.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ελέγξτε ότι ο χρόνος και η θερμοκρασία ήταν σωστά. Βλ. "Κακή ακρίβεια" παρακάτω. Επαναλάβετε την εξέταση.</li> <li>2. Κάντε προσεκτική διανομή με πιπέτα</li> <li>3. Επαναλάβετε την εξέταση.</li> <li>4. Ελέγξτε για ακαθαρσία ή φυσαλίδες αέρα στις υποδοχές. Σκουπίστε τον πυθμένα της πλάκας και διαβάστε εκ νέου.</li> </ol>
Όλα τα αποτελέσματα τα εξετάσεων είναι αρνητικά.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια δεν έχουν προστεθεί ή έχουν προστεθεί με λάθος σειρά.</li> <li>2. Η επικαλυμμένη με αντιγόνο πλάκα είναι ανενεργή.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Επανελέγξτε τη διαδικασία. Ελέγξτε για αχρησιμοποίητα αντιδραστήρια. Επαναλάβετε την εξέταση.</li> <li>2. Ελέγξτε για εμφανή υγρασία σε μη χρησιμοποιημένες υποδοχές. Σκουπίστε τον πυθμένα της πλάκας και διαβάστε εκ νέου.</li> </ol>
Όλα τα αποτελέσματα τα εξετάσεων είναι κίτρινα.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Μολυσμένα ρυθμιστικά διαλύματα ή αντιδραστήρια.</li> <li>2. Μολυσμένο διάλυμα πλύσης.</li> <li>3. Ακατάλληλη αραίωση ορού.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ελέγξτε όλα τα διαλύματα για θολερότητα.</li> <li>2. Χρησιμοποιήστε καθαρό περιέκτη. Ελέγξτε την ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται για την παρασκευή διαλύματος</li> <li>3. Επαναλάβετε την εξέταση.</li> </ol>
Κακή ακρίβεια.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Διανομή με πιπέτα με <math>\Sigma\Delta &gt; 5\%</math></li> <li>2. Ορός ή αντιδραστήρια μη επαρκώς αναμειγμένα ή που δεν έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου.</li> <li>3. Η προσθήκη αντιδραστηρίου διαρκεί υπερβολικά, ασυνέπεια σε χρονικά διαστήματα.</li> <li>4. Μη καθαρή οπτική οδός.</li> <li>5. Μη συνεπής πλύση, παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα, διάλυμα πλύσης αφημέν στις υποδοχές.</li> <li>6. Ακατάλληλη διανομή με πιπέτα</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ελέγξτε τη βαθμονόμηση της πιπέτας. Χρησιμοποιείτε τεχνική που μπορεί να αναπαραχθεί.</li> <li>2. Αναμίξτε όλα τα αντιδραστήρια απαλά αλλά καλά και αφήστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.</li> <li>3. Αναπτύξτε συνεπή ομοιόμορφη τεχνική και χρησιμοποιήστε συσκευή πολλαπλού ρύγχος ή αυτόματης διανομής για τη μείωση του χρόνου.</li> <li>4. Ελέγξτε για φυσαλίδες αέρα στις υποδοχές. Σκουπίστε τον πυθμένα της πλάκας και διαβάστε εκ νέου.</li> <li>5. Ελέγξτε ότι σε όλες τις υποδοχές έχει γίνει ομοιόμορφη πλήρωση και αναρρόφηση. Διανείμετε υγρό πάνω από το επίπεδο του αντιδραστηρίου στην υποδοχή. Μετά την τελευταία πλήρωση, αδειάστε τις υποδοχές χτυπώντας την ταινία σε απορροφητικό χαρτί.</li> <li>6. Αποφύγετε τις φυσαλίδες αέρα στα άκρα των πιπετών.</li> </ol>



**REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. ΑΝΑΦΟΡΕΣ:**

1. **Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J.** Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med.* 1995. 238: 143-152.
2. **Wieslander J, Bygren P, Heinegård D.** Anti-basement membrane antibody: Immunoenzymatic assay and specificity of antibodies. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1981. 41:763-772.
3. **Wieslander J, Bygren P, Heinegård D.** Isolation of the specific glomerular basement membrane antigen involved in Goodpasture syndrome. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1984a. 81:1544-1548.
4. **Wieslander J, et al** Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: localization to noncollagenous regions of type IV collagen. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1984b. 81:3838-3842.
5. **Segelmark M, Butkowski R, Wieslander J.** Antigen restriction and IgG subclasses among anti-GBM autoantibodies. *Nephrol Dial Transplant* 1990.5: 991-996.
6. **Hellmark T, Johansson C, Wieslander J.** Characterization of anti-GBM antibodies involved in Goodpastures syndrome. *Kidney Int.* 1994. 46: 823-829.
7. **Hellmark T, Brunmark C, Trojner J, Wieslander J.** Epitope mapping of anti-GBM antibodies with synthetic peptides. *Clin. Exp. Immunol.* 1996, 105 504-510.
8. **Saxena R, Isaksson B, Bygren P, Wieslander J.** A rapid assay for circulating anti-glomerular basement membrane antibodies in Goodpasture syndrome. *J. Immunol. Methods* 1989 118:73-78.
9. **Hellmark T, Segelmark M, Bygren P, Wieslander J.** Glomerular basement membrane antibodies. In "Autoantibodies" Eds Peter JB, Shoenfeld Y, Elsevier Science 1996, 291-298.
10. **Kleppel MM, et al.** Human tissue distribution of novel basement membrane collagen. *Am J Path.* 1989. 134 4: 813-825.
11. **Hellmark T, et al.** Identification of a clinically relevant immunodominant region in Goodpasture disease. *Kidney Int* 1999, 55, 936-944.
12. **Segelmark M, Burkhardt H, Wieslander J.** Goodpasture disease: Characterization of a single conformational epitope as the target of pathogenic autoantibodies. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 25862-25868.
13. **Gunnarsson A, et al.** Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J Biol Chem* 2000, 275, 30844-30848.
14. **Hudson B, et al..** Alport's Syndrome Goodpasture's Syndrome and type IV collagen *N Engl J Med* 2003, 348, 2543-2556.
15. **Segelmark M, Hellmark T, Wieslander J..** The prognostic significance in Goodpasture's disease of specificity, titre and affinity of anti-glomerular basement membrane antibodies. *Nephron Clin Pract* 2003, 94, 59-68.

**EXPLANATION OF SYMBOLS. EXPLICATION DE SYMBOLES. EXPLICACIÓN DE SIMBOLOS. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI. EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS. ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΣΥΜΒΟΛΩΝ.**

	Batch number. Numéro de lot. Número de lote. Chargennummer. Numero di lotto. Código do lote. Αριθμός παρτίδας.
	Product number. Référence. Número del producto. Produktnummer. Numero di prodotto. Referência de catálogo. Αριθμός προϊόντος
	Expiration date. Date d'expiration. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Data di scadenza. Prazo de validade. Ημερομηνία λήξης.
	Store at. Conserver à. Conservar a. Lagerung bei. Conservare a. Conservar a. Φυλάσσετε σε:
	Biological material. Matériel biologique. Material biológico. Biologisches Material. Materiale biologico. Material biológico. Βιολογικό υλικό.
	See instruction for use. Voir notice d'emploi. Consultar las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Consultare le istruzioni per l'uso. Consulte as instruções de utilização. Βλ. Οδηγίες χρήσης.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical pour diagnostic in vitro. Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> . In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico diagnostico in vitro. Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> . Ιατροτεχνολογικό βοήθημα που χρησιμοποιείται στη διάγνωση in vitro.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Fabbricante. Fabricante. Κατασκευαστής
	Number of tests. Nombre de tests. Número de pruebas. Anzahl der Tests. Numero di test. Número de ensaios. Αριθμός εξετάσεων
	Irritant. Irritant. Irritante. Reizend. Irritante. Irritante. Ερεθιστικό.

<b>Ag</b>	Antigen. Antigène. Antígeno. Antigen. Antigene. Antigénio. Αντιγόνο.
<b>DIL</b>	Diluent. Diluant. Diluyente. Verdünnungsmittel. Diluente. Diluente. Διαλύτης
<b>CONJ</b>	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Συζυγές.
<b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>30X</b>	Washsolution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konz. Soluzione di lavaggio conc. 30x. Solução de lavagem concentrada 30x. Διάλυμα πλύσης με συμπ. 30x.
<b>SUBS</b> <b>pNPP</b>	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Υπόστρωμα pNPP.
<b>SOLN</b> <b>STOP</b>	Stop solution. Solution d'Arrêt. Solución de interrupción. Stopplösung. Soluzione bloccante. Solução de paragem. Ανασχετικό διάλυμα.
<b>CAL</b> <b>X</b>	Calibrator. Etalon. Calibrador. Kalibrator. Calibratore. Calibrador. Βαθμονομητής.
<b>CONTROL</b> <b>X</b>	Control. Contrôle. Control. Kontrolle. Controllo. Controllo. Μάρτυρας

**UK**  
**UNITED KINGDOM**  
*Distributed by*  
A. Menarini Diagnostics Ltd  
405 Wharfedale Road  
Winnersh - Wokingham  
Berkshire RG41 5RA

**AT**  
**ÖSTEREICH**  
*Vertrieb durch*  
A. Menarini Ges.m.b.H  
Pottendorfer Straße, 25/27  
A - 11 20 Wien

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

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

**FR**  
**FRANCE**  
*Distribué par*  
A. Menarini Diagnostics  
France S.A.R.L.  
3-5, Rue du Jura  
BP 70511  
94633 Rungis Cedex

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

**ES**  
**ESPAÑA**  
*Distribuido por*  
A. Menarini Diagnostics S.A.  
Avenida del Maresme,120  
08918 Badalona  
Barcelona

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

**DE**  
**DEUTSCHLAND**  
*Vertrieb durch*  
A. Menarini Diagnostics  
Eine Division der Berlin-  
Chemie AG  
Glienicke Weg 125  
12489 Berlin

**IT**  
**ITALIA**  
*Distribuito da*  
A. Menarini Diagnostics  
Via Lungo l'Enza, 7  
50012 Bagno a Ripoli  
Firenze



Euro-Diagnostica AB, Malmo, Sweden