

EN

TMB Enzyme Substrate contains an irritant that may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. Do not ingest and avoid contact with skin and eyes.

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

Materials provided

ImmuLisa™ GBM Antibody ELISA **REF** 5154

Kits contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Microplate with individual breakaway microwells. Coated with GBM antigen. Ready for use.
1 x 1.75 ml	CONTROL + GBM	Ready to use Positive Control (red cap). Contains human serum positive for GBM antibodies. The expected concentration range in EU/ml is printed on the label.
1 x 1.75 ml	CONTROL -	Ready to use Negative Control (white cap). Contains human serum.
5 x 1.75 ml	CALIBRATOR A GBM CALIBRATOR B GBM CALIBRATOR C GBM CALIBRATOR D GBM CALIBRATOR E GBM	Ready to use set of 5 Calibrators . Calibrator A (green cap) 160 EU/ml, Calibrator B (violet cap) 80 EU/ml, Calibrator C (blue cap) 40 EU/ml, Calibrator D (yellow cap) 20 EU/ml, and Calibrator E (orange cap) 1 EU/ml. Derived from human serum containing GBM antibodies. Concentrations in EU/ml are printed on the labels.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP goat anti-human IgG Conjugate . Ready for use. Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL	Serum Diluent. Ready for use. Color coded purple.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	TMB enzyme substrate. Ready for use. Protect from light.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Stop Solution*. Ready for use.
2 x vials	BUF WASH	Powder Wash Buffer. Reconstitute to one liter each.
1 x		Protocol Sheets

Optional Components

1 x 60 ml **BUF** **WASH** Liquid concentrated Wash Buffer. **Reconstitute to one liter.**

Symbols used on labels:

LOT Lot number

REF Catalog number

IVD In vitro diagnostic use


 Use by


 Storage temperature

 Consult instructions for use

 Number of tests

 Manufacturer

 Date of Manufacture

 *Danger; Causes severe skin burns and eye damage. Causes severe eye damage. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection. Wash exposed skin thoroughly after handling. If in eyes: rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

Material required but not provided

- Deionized or distilled water

EN

- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 450 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600–650 nm
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

PROCEDURE

Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. It is suggested that reagents be left on the bench out of the box for 30 minutes prior to use. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.
- **Good washing technique is critical.** If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 or 12 wells simultaneously. This speeds the process and provides more uniform incubation times.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.

Test Method

Step 1 Let all reagents and specimens equilibrate to room temperature.

Step 2 Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.

Step 3 For a **qualitative determination** use Calibrator D (*vial with yellow cap*) only.
or

For a **semi-quantitative determination** use Calibrators A through E as depicted in the sample layout below.

Qualitative			
A	Blank	S5	Etc.
B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

Semi-Quantitative			
A	Blank	S1	Etc.
B	-	S2	
C	+	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

Step 4 Prepare a 1:101 dilution of the patient samples by mixing 5 µl of the patient sera with 500 µl of Serum Diluent.

EN

- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.
Note: Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (±5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (±5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within **30 minutes** of adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **450 nm** using a single or at 450/630 nm using a dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <10 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations the positive control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

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

1. QUALITATIVE DETERMINATION

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

It is recommended that qualitative results be reported as "positive" or "negative." Sample results greater than or equal to Calibrator D are considered positive.

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot the absorbance of Calibrator A through E against their respective concentrations on linear-log graph paper. Plot the concentrations in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw a point-to-point curve fit. Determine the concentrations of the patient samples from the curve according to corresponding absorbance values. Alternately, a four parameter curve may be used to plot the standard curve.

It is recommended that semi-quantitative results be reported as "positive," "negative," or "indeterminate" with EU/ml unit values. Indeterminate/ borderline results should be retested and evaluated along with other laboratory methods.

Interpretation

Interpretation values were determined by testing 64 normal blood donors and disease control specimens. The cutoff was established using mean of the normal subjects plus 3.5 SD for the GBM Ab ELISA and assigned an arbitrary value of 20 EU/ml. IMMCO suggests use of the reference range below. Each laboratory should validate assay values for their own conditions.

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

Calibrator

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

LIMITATIONS OF PROCEDURE

The assay should not be performed on grossly hemolyzed, microbially contaminated or lipemic samples. This method should be used for testing human serum samples only. The results obtained serve only as an aid in the diagnosis. Taken alone, these results should not be interpreted as diagnostic. Serum of patients with RPGN may be negative for GBM antibodies. Store specimens at 2–8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

EXPECTED VALUES

Test results in a normal population are usually expected to be negative. Studies of clinical populations were tested to survey positive incidence for GBM antibodies with this assay. Populations included subjects with Goodpasture's syndrome, autoimmune disease controls and presumed disease-free normal human subjects.

Disease	Expected	n	n Pos	% Pos
Goodpasture's Syndrome	95%	65	61	93.8%
Systemic lupus erythematosus	<5	8	0	0.0%
Sjögren's syndrome	<5	16	0	0.0%
Systemic sclerosis	<5	8	0	0.0%
Thyroiditis	<5	16	0	0.0%
Mixed connective tissue disease	<5	8	0	0.0%
Rheumatoid arthritis	<5	8	0	0.0%
Celiac disease	<5	8	0	0.0%
Vasculitis	<5	8	0	0.0%
Normal Human Sera	<5	163	4	2.5%
Total NHS and Disease Controls		243	4	1.6%

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The utility of the Immulisa™ GBM Antibody ELISA was evaluated by testing Goodpasture's specimens alongside disease controls and "normal" human sera. These specimens were also tested on commercially available test kits. Only specimens in the linear range of the assay were included in the method comparison. These results are summarized below.

A. Immulisa™ GBM Antibody ELISA vs. other GBM Antibody kit:

		Other GBM Antibody ELISA		
		Positive	Negative	Total
IMMCO	Positive	42	5	47
GBM Ab	Negative	0	79	79
ELISA	Total	42	84	126

Positive Percent Agreement: 100% (95% CI 89.6%–100%)
 Negative Percent Agreement: 94% (95% CI 86.0%–97.8%)
 Relative Agreement: 96% (95% CI 90.5%–98.5%)

B. Cross Reactivity: A total of 68 from individuals with associated connective tissue disorders or other potentially cross-reactive autoimmune disorders were selected to test for GBM antibodies using the Immulisa™ assay.

Condition	n	Positive
Celiac disease	8	0
Hashimoto's disease	16	0
Rheumatoid arthritis	8	0
Sjögren's syndrome	16	0
Systemic lupus erythematosus	8	0
Vasculitis	8	0
Total	64	0 (0%)

EN Precision

Precision was tested with positive specimens selected throughout the range of the assay. Assay runs of 6 replicates of each specimen were conducted on 13 days. Repeatability was determined with 12 replicates of each specimen.

S #	Mean (EU/ml)	Total Imprecision		Between days		Within run (Repeatability)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
1	12.0	1.731	14.5%	1.769	14.9%	1.521	12.9%
2	14.9	1.438	9.7%	1.461	10.0%	1.284	8.7%
3	27.0	2.536	9.4%	2.685	9.6%	1.501	5.4%
4	31.4	3.117	9.9%	3.113	10.5%	2.689	9.1%
5	106.5	4.743	4.5%	4.271	4.1%	2.914	2.8%
6	148.7	7.456	5.0%	5.902	4.1%	7.544	5.2%

Reproducibility

Qualitative reproducibility was tested with 90 runs of samples in the negative range, ~20% below cutoff, ~20% above cutoff and in the moderate positive range of the assay using the qualitative analysis method. 6 replicates were tested in 13 runs and an additional 12 replicates were tested in a following run over multiple days. Assay results for these tests produced 100% qualitative (positive/negative) agreement.

Limit of Detection

The limit of detection (LoD) was determined based on 60 replicates of the blank and 10 replicates each of 6 low-level (NHS) samples. LoD was determined to be 2.4 EU/ml.

Linearity and Recovery

Linearity and recovery were tested by diluting positive specimens through the assay range in equidistant dilutions and comparing actual vs. expected results. The linear range of the assay was determined to be 2.4 (LoD) – 160 EU/ml. Results are summarized below:

Test Range (EU/ml)	Slope (95% CI)	Y-intercept (95% CI)	R ²	% recovery (obtained/expected)
1.9 to 92.3	1.01 (.923 to 1.105)	0.7 (-4.2 to 5.6)	0.992	91% to 116%
19.7 to 108.5	1.01 (.891 to 1.131)	2.9 (-5.1 to 10.9)	0.986	101% to 117
31.1 to 180.0	0.98 (.889 to 1.070)	1.2 (-9.5 to 11.8)	0.992	92% to 104%

Interference

Interference was studied by mixing sera with known GBM antibody levels with potentially interfering serum samples and studying deviation from expected results. No significant interference was demonstrated for the following substances at the levels indicated: hemoglobin (2 g/L), bilirubin (342 µmol/L), rheumatoid factor (100 EU/ml), cholesterol (13 mmol/L), and triglycerides (37 mmol/L).

ImmuLisa™

Μέθοδος ELISA για Αντισώματα ΣΒΜ

Ανίχνευση για αντισώματα κατά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF

5154

Μέθοδος ELISA για Αντισώματα κατά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ)
96 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοαπορροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ποιοτική ή ημιποσοτική ανίχνευση των αντισωμάτων κατά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ) σε ορό ανθρώπου ως επικουρικό μέσο για τη διάγνωση αυτοάνοσων νεφρικών διαταραχών όπως το Σύνδρομο Goodpasture σε συνδυασμό με άλλα εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

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

Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω κριτήρια, η ΤΕΠΣ μπορεί να ταξινομηθεί σε α) νόσο στην οποία διαμεσολαβούν ανοσοσύνπλοκα και χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντισωμάτων κατά του DNA ή κατά του στρεπτόκοκκου, β) σύνδρομο Goodpasture και σπειραματονεφρίτιδα στην οποία διαμεσολαβούν αντισώματα κατά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ), και γ) σπειραματονεφρίτιδα σχετιζόμενη με κυτταροπλασματικά αντισώματα κατά των ουδετερόφιλων (ANCA). Σε μια μελέτη από τους Jayne et al, από 889 ασθενείς με υποψία ΤΕΠΣ, 47 (5%) εμφάνισαν αντι-ΣΒΜ αντισώματα, 246 (28%) εμφάνισαν ANCA και 576 (65%) δεν εμφάνισαν κανένα από τα δύο αντισώματα. Δύο τοις εκατό των ασθενών εμφάνισαν τόσο ANCA όσο και αντι-ΣΒΜ αντισώματα.¹

Τα αντι-ΣΒΜ αντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν είτε με έμμεσο ανοσοφθορισμό είτε με ELISA.²⁻¹⁰ Το αντιγόνο που σχετίζεται με τα αντι-ΣΒΜ αντισώματα είναι μια κολλαγονώδης περιοχή του κολλαγόνου IV.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση διεξάγεται ως ανοσοπροσδιορισμός στερεάς φάσης. Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με κεκαθαμένο αντιγόνο ΣΒΜ και στη συνέχεια με βήμα αποκλεισμού ώστε να μειωθεί η μη ειδική πρωτεΐνη που δεσμεύεται κατά τη διάρκεια εκτέλεσης της μεθόδου. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και οι οροί των ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση στο αντιγόνο των συγκεκριμένων αντισωμάτων που βρίσκονται στον ορό. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύθηκαν και άλλες πρωτεΐνες του ορού απομακρύνονται με την έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύθηκαν ανιχνεύονται με την προσθήκη στις μικροκυψελίδες σημασμένου με ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης IgG. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (TMB) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος TMB σε έγχρωμο προϊόν αντίδρασης. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml) και αναφέρονται ως θετικές ή αρνητικές.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και Προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2–8°C. **Μην τα καταψύχετε.** Τα αντιδραστήρια είναι αναλλοίωτα έως την ημερομηνία λήξης και χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες.

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

Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2–8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

EL

Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυπελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση. Οι μη χρησιμοποιημένες επικαλυμμένες ταινίες μικροκυπελίδων θα πρέπει να επανασφραγίζονται προσεκτικά στη θήκη που περιέχει αποξηραντικές ουσίες ώστε να αποφευχθεί συμπύκνωση και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2–8°C.

Προφυλάξεις

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

Το Διάλυμα Παύσης είναι διάλυμα αραιωμένου θειικού οξέως. Το θειικό οξύ (H₂SO₄) είναι δηλητηριώδες και διαβρωτικό. Μην το καταπίνετε και αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Αποφύγετε την έκθεση σε βάσεις, μέταλλα ή άλλες χημικές ενώσεις που μπορεί να αντιδρούν με οξέα.

Το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (TMB) περιέχει ερεθιστική ουσία που μπορεί να είναι επικίνδυνη σε περίπτωση εισπνοής, κατάποσης ή απορρόφησης μέσω του δέρματος. Μην το καταπίνετε και αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια.

Για τη διασφάλιση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης. Να χρησιμοποιείτε τις ορθές εργαστηριακές τεχνικές προκειμένου να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος μικροβιακής και χημικής μόλυνσης. Το κιτ να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

Υλικά που παρέχονται

ImmuLisa™ Μέθοδος ELISA για αντισώματα ΣΒΜ **REF** 5154

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Μικροπλάκα με ατομικά βυθίσματα εκκίνησης. Επενδεδυμένη με αντιγόνο ΣΒΜ. Έτοιμη προς χρήση.
1 x 1,75 ml	CONTROL + GBM	Έτοιμος προς χρήση Θετικός Έλεγχος (κόκκινο πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό θετικό για αντισώματα ΣΒΜ. Το εύρος αναμενόμενης πυκνότητας σε EU/ml εμφανίζεται στην ετικέτα.
1 x 1,75 ml	CONTROL -	Έτοιμος προς χρήση Αρνητικός Έλεγχος (λευκό πώμα). Περιέχει ανθρώπινο ορό.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A GBM CALIBRATOR B GBM CALIBRATOR C GBM CALIBRATOR D GBM CALIBRATOR E GBM	Έτοιμο προς χρήση σετ 5 Βαθμονομητών . Βαθμονομητής Α (πράσινο πώμα) 160 EU/ml, Βαθμονομητής Β (ιώδες πώμα) 80 EU/ml, Βαθμονομητής Γ (μπλε πώμα) 40 EU/ml, Βαθμονομητής Δ (κίτρινο πώμα) 20 EU/ml, και Βαθμονομητής Ε (πορτοκαλί πώμα) 1 EU/ml. Προερχόμενα από ανθρώπινο ορό που περιέχει αντισώματα ΣΒΜ. Συγκεντρώσεις σε EU/ml αναγράφονται στις ετικέτες.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Σύζευξη ορού ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης G από υπεροξειδάση από ραφανίδα. Έτοιμη προς χρήση. Κωδικοποιημένο με ροζ χρώμα.
1 x 60 ml	DIL	Αραιωτικό ορού. Έτοιμο προς χρήση. Κωδικοποιημένο με ιώδες χρώμα.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Ενζυμο-υπόστρωμα τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB). Έτοιμο προς χρήση. Προστατέψτε από το φως.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Διάλυμα παύσης*. Έτοιμο προς χρήση.
2 x vials	BUF WASH	Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.
1 x		Φύλλα πρωτοκόλλου

Προαιρετικά Συστατικά

1 x 60 ml **BUF** **WASH** Υγρό συμπυκνωμένο ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. **Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.**

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT	Αριθμός Παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
IVD	Διαγνωστική χρήση in vitro



Χρήση έως



Θερμοκρασία αποθήκευσης



Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης



Αριθμός δοκιμών



Κατασκευαστής



Ημερομηνία κατασκευής



*Κίνδυνος. Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Πλύνετε σχολαστικά μετά το χειρισμό. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια / πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ (ή με τα μαλλιά): Βγάλτε αμέσως όλα τα μολυσμένα ρούχα. Ξεπλύνετε την επιδερμίδα με νερό/στο ντους. Εάν δεν υποχωρεί ο οφθαλμικός ερεθισμός: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό.

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα
- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωληνίων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικό χαρτί
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 450 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600–650 nm
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση διαβάστε προσεκτικά αυτές τις οδηγίες.
- Προετοιμάστε όλες τις αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών προτού ξεκινήσετε την ανάλυση.
- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Συνιστάται να αφήνετε τα αντιδραστήρια στον πάγκο έξω από το κουτί για 30 λεπτά πριν από τη χρήση. Επιστρέψτε τα υλικά και τα αντιδραστήρια που δεν χρησιμοποιήθηκαν στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Αφαιρέστε από τη θήκη τις απαιτούμενες ταινίες μικροκυψελίδων και επανασφραγίστε προσεκτικά τη θήκη ώστε να αποτραπεί τυχόν συμπίκνωση υδρατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.
- **Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης.** Εάν η έκπλυση δεν εκτελείται αυτόματα, επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας μια ισχυρή ριπή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από μια φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο κατά μήκος ολόκληρου του πλακιδίου. **Συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό, επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Σε όλα τα βήματα είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των χρόνων. Όλες οι περίοδοι επώασης ξεκινούν με την ολοκλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια σειρά.

Μέθοδος ανάλυσης

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

Ποιοτικός Προσδιορισμός			
A	Κενό	S5	Κλπ.
B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

Ημιποσοτικός Προσδιορισμός			
A	Κενό	S1	Κλπ.
B	-	S2	
C	+	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

- Βήμα 4** Προετοιμάστε μια αραιώση των δειγμάτων ασθενών σε αναλογία **1:101**, αναμιγνύοντας **5 μl** του δείγματος του ασθενούς με **500 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
- Βήμα 5** Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από τη θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες που υπάρχουν στη σφραγισμένη θήκη στο ψυγείο. Τοποθετήστε σταθερά τις μικροκυψελίδες στο πλαίσιο στήριξης που διατίθεται.
- Βήμα 6** Προσθέστε **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενών (**1:101**) στις κατάλληλες μικροκυψελίδες, όπως υποδεικνύεται στο φύλλο πρωτοκόλλου.
- Σημείωση:** Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριο. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριο.
- Βήμα 7** Επώαστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** Εκπλύνετε **4x** με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας το πλακίδιο και κτυπώντας το ελαφρά ώστε να αδειάσουν όλες οι κυψελίδες ή αναροφώντας το υγρό από κάθε κυψελίδα. Για να στυπώσετε στο τέλος της τελευταίας έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 10** Επώαστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 8.
- Βήμα 12** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 13** Επώαστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός 1 ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **450 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 450/630 nm, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκαν έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριο, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι $<0,3$. Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <10 EU/ml. Εάν η εξέταση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

Υπολογισμοί

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

1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος}}{\text{Απ/ση του Βαθμονομητή D}} \times \text{EU/n I του Βαθμονομητή D} = \text{EU/Π I του εξεταζόμενου δείγματος}$$

Συνιστάται τα ποιοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά” ή “αρνητικά.” Τα αποτελέσματα δειγμάτων που είναι μεγαλύτερα από ή ίσα με τον Βαθμονομητή Δ θεωρούνται θετικά.

2. HMI-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών Α έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των Χ τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Υ την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης τους. Εναλλακτικά, καμπύλη τεσσάρων παραμέτρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να απεικονίσετε την πρότυπη καμπύλη.

Συνιστάται τα ημι-ποσοτικά αποτελέσματα να αναφέρονται ως “θετικά,” “αρνητικά,” ή “απροσδιόριστα” με τιμές μονάδας EU/ml. Τα απροσδιόριστα/οριακά αποτελέσματα θα πρέπει να επανελέγχονται και αξιολογούνται μαζί με άλλες εργαστηριακές μεθόδους.

Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με δοκιμή 64 απλών δοτών αίματος και δείγματα ελέγχου νόσου. Το σημείο διαχωρισμού καθιερώθηκε χρησιμοποιώντας τον μέσο όρο των συνήθων αντικειμένων συν 3.5 SD για το αντίσωμα κατά ΣΒΜ ELISA και καθόρισε την αυθαίρετη τιμή των 20 EU/ml. Η IMMCO προτείνει τη χρήση του παρακάτω εύρους αναφοράς. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να επικυρώνει τις τιμές δοκιμασίας για τις δικές τους συνθήκες.

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

Βαθμονομητής

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

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση δεν θα πρέπει να εκτελείται σε δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, σε μολυσμένα από μικρόβια ή λιπαιμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για την εξέταση δειγμάτων ορού ανθρώπου. Τα αποτελέσματα που επιτυγχάνονται εξυπηρετούν μόνον ως βοήθημα στη διάγνωση. Μόνα τους, αυτά τα αποτελέσματα δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται ως διαγνωστικά. Ορός ασθενών με ταχέως εξελισσόμενη προοδευτική σπειραματονεφρίτιδα (ΤΕΠΣ) ενδέχεται να είναι αρνητικά για αντισώματα ΣΒΜ. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2–8°C για διάστημα όχι μεγαλύτερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε να ψύχετε και αποψύχετε τα δείγματα.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Οι αναμενόμενες τιμές σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρνητικές. Μελέτες κλινικών πληθυσμών ελέγχθηκαν για θετική συχνότητα μελέτης για αντισώματα ΣΒΜ με αυτήν την μέθοδο. Οι πληθυσμοί περιελάμβαναν υποκείμενα με σύνδρομο Goodpasteur, ελέγχους αυτοάνοσης νόσου και αναμενόμενα άνοσα φυσιολογικά ανθρώπινα υποκείμενα.

Νόσος	Αναμενόμενο	n ΘΕΤ	n	% ΘΕΤ
Σύνδρομο Goodpasture	95%	65	61	93,8%
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	<5	8	0	0,0%
Σύνδρομο Sjögren	<5	16	0	0,0%
Συστημική σκλήρωση	<5	8	0	0,0%
Θυρεοειδίτιδα	<5	16	0	0,0%
Μεικτή νόσος του συνδετικού ιστού (MCTD)	<5	8	0	0,0%
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	<5	8	0	0,0%
Κοιλιοκάκη	<5	8	0	0,0%
Αγείτιδα	<5	8	0	0,0%

EL

Φυσιολογικοί Ανθρώπινοι Οροί (NHS)	<5	163	4	2,5%
Σύνολο NHS και Ελέγχων Νόσου		243	4	1,6%

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η χρησιμότητα του ImmuLisa™ Αντισώματος κατά ΣΒΜ ELISA αξιολογήθηκε με δοκιμή δειγμάτων Goodpasture μαζί με ελέγχους νόσων και “φυσιολογικούς” ανθρώπινους ορούς. Αυτά τα δείγματα δοκιμάστηκαν επίσης σε εμπορικά διαθέσιμα kit. Μόνον δείγματα στο γραμμικό φάσμα της δοκιμασίας συμπεριελήφθησαν στην σύγκριση της μεθόδου. Αυτά τα αποτελέσματα συνοψίζονται κατωτέρω.

A. ImmuLisa™ Αντίσωμα ΣΒΜ ELISA έναντι άλλου kit Αντισώματος ΣΒΜ:

		Άλλο Αντίσωμα ΣΒΜ ELISA		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
IMMCO	Θετικό	42	5	47
GBM Ab	Αρνητικό	0	79	79
ELISA	Σύνολο	42	84	126

Συμφωνία Θετικού Ποσοστού: 100% (95% CI 89,6%–100%)

Συμφωνία Αρνητικού Ποσοστού: 94% (95% CI 86,0%–97,8%)

Σχετική Συμφωνία: 96% (95% CI 90,5%–98,5%)

B. Διασταυρωτή Αντιδραστικότητα: Ένα σύνολο από 68 άτομα με σχετιζόμενες διαταραχές συνδετικού ιστού ή άλλες πιθανής διασταυρούμενης αντίδρασης αυτοάνοσες διαταραχές επελέγησαν για έλεγχο αντισωμάτων για ΣΒΜ χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία ImmuLisa™.

Πάθηση	n	Θετικό
Κοιλιοκάκη	8	0
Νόσος του Hashimoto	16	0
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	8	0
Σύνδρομο Sjögren	16	0
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	8	0
Αγγειίτιδα	8	0
Σύνολο	64	0 (0%)

Ακρίβεια

Η ακρίβεια δοκιμάστηκε με θετικά δείγματα που επιλέχθηκαν από όλο το φάσμα της δοκιμασίας. 6 σειρές δοκιμασιών επαναλήψεων πειράματος (replicates) διεξήχθησαν σε κάθε δείγμα σε διάστημα 13 ημερών. Η επαναληψιμότητα προσδιορίστηκε με 12 επαναλήψεις πειράματος κάθε δείγματος.

Αρ. δείγματος (S #)	Μέσος όρος (EU/ml)	Ολική Ανακρίβεια		Μεταξύ ημερών		Εντός προσδιορισμού (Επαναληψιμότητα)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
1	12,0	1,731	14,5%	1,769	14,9%	1,521	12,9%
2	14,9	1,438	9,7%	1,461	10,0%	1,284	8,7%
3	27,0	2,536	9,4%	2,685	9,6%	1,501	5,4%
4	31,4	3,117	9,9%	3,113	10,5%	2,689	9,1%
5	106,5	4,743	4,5%	4,271	4,1%	2,914	2,8%
6	148,7	7,456	5,0%	5,902	4,1%	7,544	5,2%

Αναπαραγωγιμότητα

Εύρος δοκιμής (EU/ml)	Κλίση (95% CI)	Σημείο τομής Y (95% CI)	R ²	% ανάκαμψης (επιτευχθείσα/ αναμενόμενη)
1,9 έως 92,3	1,01 (0,923 έως 1,105)	0,7 (-4,2 έως 5,6)	0,992	91% έως 116%
19,7 έως 108,5	1,01 (0,891 έως 1,131)	2,9 (-5,1 έως 10,9)	0,986	101% έως 117
31,1 έως 180,0	0,98 (0,889 έως 1,070)	1,2 (-9,5 έως 11,8)	0,992	92% έως 104%

EL Παρέμβαση

Η παρέμβαση μελετήθηκε με την ανάμειξη ορών με γνωστά επίπεδα αντισώματος ΣΒΜ με δείγματα ορού πιθανώς παρεμβαλλόμενα. Η ποιοτική αναπαραγωγιμότητα δοκιμάστηκε με 90 δοκιμασίες δειγμάτων στο αρνητικό εύρος, ~20% κάτω του σημείου διαχωρισμού, ~20% άνω του σημείου διαχωρισμού και στο μέτρια θετικό εύρος της δοκιμασίας χρησιμοποιώντας την μέθοδο της ποιοτικής ανάλυσης. 6 επαναλήψεις των ίδιων δειγμάτων δοκιμάστηκαν σε 13 εκτελέσεις και επιπρόσθετα 12 ίδια δείγματα δοκιμάστηκαν σε ακόλουθη εκτέλεση επί σειρά πολλαπλών ημερών. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας γι' αυτά τα δείγματα παρήγαγαν 100% ποιοτική (θετική/αρνητική) συμφωνία.

Όριο Ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (LoD) για αυτήν τη δοκιμασία επί τη βάση 60 πανομοιότυπων κενού και 10 πανομοιότυπων καθένα από 6 δείγματα χαμηλού επιπέδου (NHS). Το LoD καθορίστηκε να είναι 2,4 EU/ml.

Γραμμικότητα και Ανάκαμψη

Η γραμμικότητα και η ανάκαμψη δοκιμάστηκαν αραιώνοντας θετικά δείγματα σε όλο το εύρος της δοκιμασίας σε ισαπέχουσες αραιώσεις και συγκρίνοντας πραγματικές έναντι αναμενόμενων τιμών. Το γραμμικό εύρος της δοκιμασίας καθορίστηκε να είναι 2.4 (LoD) – 160 EU/ml. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω: και με την μελέτη απόκλισης από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Καμία σημαντική παρέμβαση δεν εκδηλώθηκε για τις ακόλουθες ουσίες στα επίπεδα που δηλώνονται: Αιμοσφαιρίνη (2 g/L), Χολερυθρίνη (342 μmol/L), Ρευματοειδής Παράγοντας (100 EU/ml), χοληστερίνη (13 mmol/L), και τριγλυκερίδια (37 mmol/L).

ImmuLisa™

ELISA para anticuerpos MBG

Detección de anticuerpos anti membrana basal glomerular (MBG)

IVD

PROSPECTO

REF 5154 ELISA para anticuerpos MBG 96 análisis

USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección cualitativa o semi cuantitativa de anticuerpos anti membrana basal glomerular (MBG) en suero humano como ayuda en el diagnóstico de enfermedades renales autoinmunes como el síndrome de Goodpasture junto con otros análisis de laboratorio y clínicos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La glomerulonefritis de rápida progresión (GNRP) es un síndrome clínico que se desarrolla en días o semanas y caracterizado por la glomerulonefritis semilunar en histopatología del riñón. Tiene un pronóstico malo si no se reconoce a tiempo y se establece un tratamiento adecuado. Para facilitar la gestión del paciente, GNRP se puede clasificar basándose en a) la evaluación clínica, b) estudios de inmunofluorescencia directa y microscópicos de electrones de biopsia renal y c) estudios de anticuerpos séricos.

Utilizando los criterios anteriores, GNRP se puede clasificar en a) enfermedad de complejos inmunes caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-ADN o anticuerpos anti-estreptocócicos, b) glomerulonefritis mediada por anti membrana basal glomerular (MBG) y síndrome de Goodpasture y c) glomerulonefritis asociada con anticuerpos antineutrófilo citoplasmático (ANCA). Según un estudio realizado por Jayne et al, sobre 889 pacientes en que se sospechaba GNRP, 47 de ellos (5%) tenían anticuerpos anti membrana basal glomerular, 246 (28%) presentaban ANCA y 576 (65%) no presentaban ninguno de los dos anticuerpos. El 2% tenía ambos anticuerpos, tanto ANCA como anti MBG.¹

Los anticuerpos anti MBG se detectan mediante inmunofluorescencia indirecta o mediante ELISA.²⁻¹⁰ El antígeno asociado a los anticuerpos anti MBG es un dominio no colágeno del colágeno IV.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Inmunoensayo de base sólida. Los pocillos se recubren con antígeno purificado de MBG, a continuación se bloquean los puntos que no han reaccionado para reducir las uniones de proteínas no específicas durante la ejecución del ensayo. Se incuban los controles, calibradores y muestras de suero del paciente en los pocillos recubiertos de antígeno permitiendo que los anticuerpos específicos presentes en el suero se unan al antígeno. Los anticuerpos que no se han unido y demás proteínas séricas se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se detectan añadiendo un conjugado de IgG antihumano marcado con un enzima a los pocillos. Se elimina por lavado todo el conjugado no unido. Se añade a los pocillos un substrato enzimático específico (TMB); la presencia de anticuerpos es revelada por un cambio de color producido por la conversión del substrato TMB a un producto de reacción coloreado. Una vez detenida la reacción enzimática, mediante espectrofotómetro a 405 nm se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración del anticuerpo. Los resultados se expresan en unidades enzimáticas por mililitro (EU/ml) y se presentan en un informe como positivos o negativos.

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2–8°C. **No los congele.** Los reactivos permanecen estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y se manipulan como se indica.

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

Reconstituya el tampón de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Conservado a 2–8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez. Cierre herméticamente y con cuidado las tiras de micropocillos en el sobre con sustancias desecantes para evitar la condensación y almacénelo a 2–8°C.

ES

Precauciones

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

La solución Stop es una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico (H₂SO₄) es venenoso y corrosivo. No lo ingiera y evítese el contacto con los ojos y la piel. Evítese la exposición a bases, metales u otros componentes que puedan ser reactivos a los ácidos.

El sustrato enzimático TMB contiene un irritante que puede ser perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe mediante la piel. No lo ingiera y evítese el contacto con los ojos y la piel.

Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto. No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen. Durante la manipulación, respete las buenas prácticas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y cruzada de reactivos. No utilice el producto después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas.

Materiales suministrados

ELISA para anticuerpos MBG ImmuLisa™ **REF** 5154





Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Microplaca con micropocillos individuales separables. Revestidos con antígeno MBG. Listo para usar.
1 x 1,75 ml	CONTROL + GBM	Control positivo listo para usar (tapa roja). Contiene suero humano positivo con anticuerpos MBG. El intervalo de concentración esperado en EU/ml está impreso en la etiqueta.
1 x 1,75 ml	CONTROL -	Control negativo listo para usar (tapa blanca). Contiene suero humano.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A GBM CALIBRATOR B GBM CALIBRATOR C GBM CALIBRATOR D GBM CALIBRATOR E GBM	Conjunto de 5 calibradores listo para usar. Calibrador A (tapa verde) 160 EU/ml, calibrador B (tapa violeta) 80 EU/ml, calibrador C (tapa azul) 40 EU/ml, calibrador D (tapa amarilla) 20 EU/ml y calibrador E (tapa naranja) 1 EU/ml. Derivado de suero humano que contiene anticuerpos MBG. Las concentraciones en EU/ml están impresas en las etiquetas.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugado IgG anti humana de cabra HRP. Listo para usar. Color rosado.
1 x 60 ml	DIL	Diluyente de suero. Listo para usar. Color morado.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Sustrato enzimático TMB. Listo para usar. Protéjase de la luz.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Solución Stop*. Listo para usar.
2 x viales	BUF WASH	Tapón de lavado en polvo. Reconstruir cada unidad hasta un litro.
1 x		Hojas de protocolo

Componentes opcionales

1 x 60 ml **BUF** **WASH** Tapón de lavado concentrado en líquido. **Reconstruir hasta un litro.**

Símbolos utilizados en las etiquetas:

LOT	Número de lote
REF	Número de catálogo
IVD	Utilización diagnóstica in vitro
	Utilizar antes de
	Temperatura de almacenamiento
	Consulte las instrucciones de uso
	Número de análisis

ES



Fabricante



Fecha de fabricación



*Peligro. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Provoca lesiones oculares graves. Lavarse concienzudamente tras la manipulación. Llevar guantes/ prendas/gafas/máscara de protección. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

Materiales necesarios no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para el tapón de lavado diluido
- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbencia a 450 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600–650 nm
- Lavador automático de microplaca con capacidad de 200 µl

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

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

PROCEDIMIENTO

Advertencias preliminares

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente antes de dar comienzo a la prueba. Se sugiere que se dejen los reactivos en el banco fuera de la caja por 30 minutos antes de utilizarlos. Vuelva a poner de inmediato en la nevera los reactivos y muestras no utilizados.
- Saque las tiras de micropocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.
- **Una buena técnica de lavado es crucial.** Si efectúa el lavado manualmente, rocíe toda la microplaca con un fuerte chorro de solución de lavado, utilizando una botella de boca ancha. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 o 12 pocillos. De este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.
- Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia.

Procedimiento del ensayo

Paso 1 Los reactivos deben estar a temperatura ambiente.

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

ES

Paso 3 Para la **determinación cualitativa**, use únicamente el Calibrador D (vial de tapa amarilla).
o
Para la **determinación semi cuantitativa**, use los calibradores de A a E como se muestra en el ejemplo siguiente:

Determinación cualitativa				Determinación semi cuantitativa			
A	Blank	S5	Etc.	A	Blank	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+I	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

Paso 4 Prepare una disolución de **1:101** de la muestra del paciente, mezclando **5 µl** de suero con **500 µl** de diluyente de suero.

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

Paso 6 Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, controles positivo y negativo y muestras del paciente (**1:101**) en los correspondientes pocillos, como se indica más arriba en el esquema. **Nota:** Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo.

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

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

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

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

Paso 11 Lave los pocillos repitiendo el paso 8.

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

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

Paso 14 Pipetee **100 µl** de solución Stop en cada pocillo en la misma secuencia y tiempos en que añadió el sustrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de **30 minutos** después de haber añadido la solución Stop.

Paso 15 Lea la absorbancia de cada pocillo a **450 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 450/630 nm comparándola con el blanco reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser $<0,3$. La lectura de absorbancia del calibrador A no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <10 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de ambas lecturas para determinar las EU/ml. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la absorbancia del calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

RESULTADOS

Cálculos

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

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

$$\frac{\text{Abs. de muestra analizada}}{\text{Abs. de Calibrador D}} \times \text{EU/ml de Calibrador D} = \text{EU/ml muestra analizada}$$

Se recomienda que los resultados cualitativos se registren como "positivo" o "negativo". Los resultados de muestra superiores o iguales a Calibrador D se consideran positivos.

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

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

Se recomienda que los resultados semi cuantitativos se registren como “positivo”, “negativo” o “incierto” con los valores de unidad EU/ml. Los resultados incierto/ valores límite deben analizarse de nuevo y evaluar junto con otros métodos de laboratorio.

Interpretación

Los valores de interpretación se determinaron analizando 64 donantes de sangre normal y muestras de control de enfermedades. El corte se estableció utilizando la media de los sujetos normales más 3,5 de desviación estándar (ED) de ELISA para anticuerpos MBG y se asignó un valor arbitrario de 20 EU/ml. IMMCO sugiere la utilización de los límites de referencia de abajo. Cada laboratorio validará los valores de ensayo para sus propias condiciones.

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

Calibrador

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

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo no debe efectuarse en muestras muy hemolizadas, contaminadas por microbios o lipémicas. Este método debe utilizarse únicamente para analizar muestras de suero humano. Los resultados obtenidos se utilizarán sólo como ayuda en el diagnóstico. No deben considerarse como un diagnóstico por sí solos. El suero de pacientes con GNRP podría resultar negativo a los anticuerpos MBG. Conserve las muestras a 2°–8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

VALORES ESPERADOS

En general, se espera que los resultados de la prueba en una población normal sean negativos. Con este ensayo se analizaron los estudios de poblaciones clínicas para establecer la incidencia positiva de los anticuerpos MBG. Entre las poblaciones se incluyen los sujetos con el síndrome de Goodpasture, controles de enfermedad autoinmune y sujetos humanos sin presunta enfermedad.

Enfermedad	Esperado	n	n Pos	% Pos
Síndrome de Goodpasture	95%	65	61	93.8%
Lupus eritematoso sistémico	<5	8	0	0,0%
Síndrome de Sjögren	<5	16	0	0,0%
Esclerosis sistémica	<5	8	0	0,0%
Tiroiditis	<5	16	0	0,0%
Enfermedad mixta del tejido conectivo	<5	8	0	0,0%
Artritis reumatoide	<5	8	0	0,0%
Enfermedad celíaca	<5	8	0	0,0%
Vasculitis	<5	8	0	0,0%
Suero humano normal	<5	163	4	2,5%
Total SHN y controles de enfermedad		243	4	1,6%

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

La utilidad de ELISA para anticuerpos MBG ImmuLisa™ se evaluó analizando muestras de Goodpasture junto con controles de enfermedad y suero humano “normal”. Asimismo estas muestras se analizaron en kits de prueba disponibles en el mercado. Sólo muestras en el intervalo lineal del ensayo se incluyeron en la comparación de métodos. A continuación se resumen estos resultados.

A. ELISA para anticuerpos MBG ImmuLisa™ vs. otro kit de anticuerpo MBG:

		Otro ELISA para anticuerpos MBG		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	42	5	47

ES

Anticuerpos MBG	Negativo	0	79	79
ELISA	Total	42	84	126

Acuerdo de porcentaje positivo: 100% (95% IC 89,6%–100%)

Acuerdo de porcentaje negativo: 94% (95% IC 86,0%–97,8%)

Acuerdo relativo: 96% (95% IC 90,5%–98,5%)

B. Reactividad cruzada: Con el ensayo ImmLisa™ se seleccionaron un total de 68 de individuos con trastornos del tejido conectivo asociativo u otros trastornos potenciales autoinmunes de reactividad cruzada para analizar anticuerpos MBG.

Estado	n	Positivo
Enfermedad celíaca	8	0
Enfermedad de Hashimoto	16	0
Artritis reumatoide	8	0
Síndrome de Sjögren	16	0
Lupus eritematoso sistémico	8	0
Vasculitis	8	0
Total	64	0 (0%)

Precisión

Con muestras positivas seleccionadas a través del intervalo del ensayo se analizó la precisión. Los ensayos de 6 repeticiones de cada muestra se realizaron en 13 días. Con 12 repeticiones de cada muestra se determinó la repetibilidad.

E n.º	Media (EU/ml)	Imprecisión total		Entre días		Dentro del ensayo (Repetibilidad)	
		DE (EU/ml)	CV%	DE (EU/ml)	CV%	DE (EU/ml)	CV%
1	12,0	1,731	14,5%	1,769	14,9%	1,521	12,9%
2	14,9	1,438	9,7%	1,461	10,0%	1,284	8,7%
3	27,0	2,536	9,4%	2,685	9,6%	1,501	5,4%
4	31,4	3,117	9,9%	3,113	10,5%	2,689	9,1%
5	106,5	4,743	4,5%	4,271	4,1%	2,914	2,8%
6	148,7	7,456	5,0%	5,902	4,1%	7,544	5,2%

Reproducibilidad

La reproducibilidad cualitativa se analizó con 90 ejecuciones de muestras en el intervalo negativo, ~20% por debajo del corte, ~20% por encima del corte y en el intervalo moderado positivo del ensayo utilizando el método de análisis cualitativo. Se analizaron 6 repeticiones en 13 ensayos y 12 repeticiones adicionales en el siguiente ensayo durante varios días. Los resultados del ensayo de estas pruebas produjeron acuerdos 100% cualitativos (positivo/negativo).

Límite de detección

El límite de detección (LoD) se determina basándose en las 60 repeticiones del blanco y 10 repeticiones de cada muestra (SHN) de nivel bajo. El LoD resultó ser 2,4 EU/ml.

Linealidad y recuperación

La linealidad y recuperación se analizaron diluyendo las muestras positivas mediante el intervalo del ensayo en diluciones equidistantes y comparando los resultados reales con los esperados. El intervalo lineal del ensayo resultó ser 2,4 (LoD) – 160 EU/ml. Los resultados se presentan a continuación:

Intervalo de prueba (EU/ml)	Pendiente (95% CI)	Intercepción en Y (95% CI)	R²	% de recuperación (obtenido/esperado)
1,9 a 92,3	1,01 (0,923 a 1,105)	0,7 (-4,2 a 5,6)	0,992	91% a 116%
19,7 a 108,5	1,01 (0,891 a 1,131)	2,9 (-5,1 a 10,9)	0,986	101% a 117
31,1 a 180,0	0,98 (0,889 a 1,070)	1,2 (-9,5 a 11,8)	0,992	92% a 104%

ES

Interferencia

La interferencia se estudió mezclando suero con niveles de anticuerpos MBG conocidos con muestras potenciales de suero interfirientes y estudiando la desviación de los resultados esperados. No se demostró ninguna interferencia significativa de las sustancias siguientes a los niveles indicados: hemoglobina (2 g/L), bilirrubina (342 μ mol/L), factor reumatoide (100 EU/ml), colesterol (13 mmol/L) y triglicéridos (37 mmol/L).



ImmuLisa™

GBM-Antikörper-ELISA

Nachweis von glomerulären Basalmembran (GBM) Antikörpern

IVD

BEIPACKTEXT

REF 5154 GBM Antikörper-ELISA 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Ein enzymgekoppelter Immunsorptionsstest (ELISA) für den qualitativen oder semiquantitativen Nachweis von glomerulären Basalmembran (GBM) Antikörpern im Humanserum als eine Hilfe in der Diagnoseautoimmuner Nierenerkrankungen wie beispielsweise das Goodpasture-Syndrom in Verbindung mit anderen klinischen und Laborbefunden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

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

Unter Verwendung der obigen Kriterien kann RPGN wie folgt klassifiziert werden: a) Immunkomplex-vermittelte Erkrankung, die durch das Vorhandensein von Anti-DNA-Antikörpern oder Anti-Streptokokken-Antikörpern gekennzeichnet ist, b) durch Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM) vermittelte Glomerulonephritis und Goodpasture-Syndrom und c) mit antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) verbundene Glomerulonephritis. In einer Studie von Jayne et al hatten von 889 Patienten, bei denen ein Verdacht auf RPGN bestand, 47 (5%) Anti-GBM-Antikörper, 246 (28%) ANCA und 576 (65%) keinen der beiden Antikörper. Bei zwei Prozent wurden sowohl ANCA als auch Anti-GBM-Antikörper gefunden¹.

Anti-GBM-Antikörper können durch indirekte Immunfluoreszenz oder ELISA nachgewiesen werden²⁻¹⁰. Das mit Anti-GBM-Antikörpern verbundene Antigen ist eine nicht-kollagene Domäne von Kollagen IV.

TESTPRINZIP

Der Test wird als ein Festphasenimmunoassay ausgeführt. Die Mikrovertiefungen werden mit gereinigtem GBM-Antigen beschichtet. Dem folgt ein Blockierungsschritt, um eine nichtspezifische Proteinbindung während des Prüfungsablaufs zu reduzieren. Kontrollen, Kalibratoren und Patientenserum werden in den mit Antigen beschichteten Vertiefungen inkubiert, um im Serum vorhandenen spezifischen Antikörpern zu ermöglichen, sich an das Antigen zu binden. Ungebundene Antikörper und andere Serum-Proteine werden durch Waschen der Mikrovertiefungen entfernt. Bestimmte Antikörper werden durch Hinzufügen von einem enzymmarkierten anti-menschlichen IgG-Konjugat zu den Mikrovertiefungen nachgewiesen. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Spezifisches Enzymsubstrat (TMB) wird dann zu den Vertiefungen hinzugefügt und das Vorhandensein von Antikörpern wird durch einen Farbwechsel, erzeugt durch die Umwandlung des TMB-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt, erkannt. Die Reaktion wird gestoppt und die Intensität des Farbwechsels, der zur Konzentration an Antikörpern proportional ist, wird durch ein Spektralphotometer bei 450 nm abgelesen. Die Resultate werden in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) ausgedrückt und als positiv oder negativ berichtet.

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2–8 °C lagern. **Nicht einfrieren.** Die Reagenzien sind bis zum Ablaufdatum stabil, wenn sie wie angewiesen gelagert und behandelt werden.

Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20–25 °C) gebracht werden.

Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Bei Lagerung bei 2–8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar.

Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt. Ungebrauchte Mikrotitervertiefungsstreifen sollten im Trocknungsmittel enthaltenden Beutel sorgfältig wieder versiegelt werden, um Kondensation zu verhindern, und bei 2-8°C gelagert werden.

DE

Vorsichtsmaßnahmen

Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis.¹¹

Die Stopplösung ist eine verdünnte Schwefelsäurelösung. Schwefelsäure (H₂SO₄) ist giftig und ätzend. Nicht einnehmen und den Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden. Die Exponierung gegenüber Basen, Metallen oder anderen Verbindungen vermeiden, die mit Säuren reagieren können.

TMB-Enzymsubstrat enthält einen Reizstoff, der schädlich sein kann, wenn er eingeatmet, aufgenommen oder durch die Haut absorbiert wird. Nicht einnehmen und den Kontakt mit der Haut und den Augen vermeiden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kit-Komponenten nicht mit denjenigen von anderen Quellen aus. Befolgen Sie gute Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

ImmuLisa™ GBM-Antikörper-ELISA **REF** 5154






Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit GBM-Antigen beschichtet. Gebrauchsfertig.
1 x 1,75 ml	CONTROL + GBM	Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (rote Kappe). Enthält GBM-Antikörper-positives Humanserum. Der erwartete Konzentrationsbereich in EU/ml ist auf dem Etikett aufgedruckt.
1 x 1,75 ml	CONTROL -	Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (weiße Kappe). Enthält Humanserum.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A GBM CALIBRATOR B GBM CALIBRATOR C GBM CALIBRATOR D GBM CALIBRATOR E GBM	Gebrauchsfertiger Satz von 5 Kalibratoren . Kalibrator A (grüne Kappe) 160 EU/ml, Kalibrator B (violette Kappe) 80 EU/ml, Kalibrator C (blaue Kappe) 40 EU/ml, Kalibrator D (gelbe Kappe) 20 EU/ml und Kalibrator E (orangefarbene Kappe) 1 EU/ml. Abgeleitet von Humanserum, das GBM-Antikörper enthält. Konzentrationen in EU/ml sind auf den Etiketten aufgedruckt.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	HRP Ziege anti-menschliches IgG-Konjugat . Gebrauchsfertig. Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	DIL	Serumverdünnungsmittel. Gebrauchsfertig. Farbkennzeichnung violett.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	TMB-Enzymsubstrat. Gebrauchsfertig. Vor Licht schützen.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Stopplösung*. Gebrauchsfertig.
2 x Phiolen	BUF WASH	Pulver Waschpuffer. Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.
1 x		Protokollblätter

Optionale Komponenten

1 x 60 ml **BUF** **WASH** Flüssiger konzentrierter Waschpuffer. **Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.**

Auf den Etiketten verwendete Symbol:

LOT	Chargennummer
REF	Katalognummer
IVD	In vitro diagnostischer Gebrauch
	Verwenden bis
	Lagertemperatur
	Finden Sie Anweisungen für die Verwendung
	Anzahl an Tests
	Hersteller

DE



Herstellungsdatum



* Gefahr. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Verursacht schwere Augenschäden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 450 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600–650 nm eingestellt werden.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2–8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben. Es wird empfohlen, eingefrorene Proben innerhalb eines Jahres zu prüfen.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie die Produktbeilage vor dem Beginn der Untersuchung sorgfältig durch.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens, bis die Serumproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht haben. Es wird empfohlen, dass Reagenzien vor dem Gebrauch auf dem Labortisch außerhalb des Kastens für 30 Minuten verbleiben. Stellen Sie alle nichtverwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.
- **Eine gute Waschtechnik ist entscheidend.** Eine gute Waschmethode ist unerlässlich. Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschpuffer über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.

Testmethode

Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

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

Schritt 3 Verwenden Sie für eine **Qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen Kalibrator D (*Fläschchen mit gelber Kappe*).
oder
Verwenden Sie für eine **Semi-Quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis E, wie in der Probenanordnung unten gezeigt.

Qualitativ			
A	Leerprobe	S5	usw.
B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

Semiquantitativ			
A	Leerprobe	S1	usw.
B	-	S2	
C	+	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

- Schritt 4** Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit 500 µl Probenverdünner vermischen.
- Schritt 5** Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Vertiefungen sicher in den mitgelieferten Halter ein.
- Schritt 6** Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben (**1:101**) in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.
Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null.
- Schritt 7** Inkubieren Sie **30 Minuten** (±5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 8** Waschen Sie **4x** mit Waschpuffer. Wenn Sie manuell waschen, füllen Sie jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.
- Schritt 9** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 10** Inkubieren Sie **30 Minuten** (±5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 11** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.
- Schritt 12** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 13** Inkubieren Sie **30 Minuten** (±5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 14** Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie die Extinktionswerte innerhalb von **30 Minuten** nach Hinzufügen der Stopplösung ab.
- Schritt 15** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **450 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 450/630 nm.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und die Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte <0,3 sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <10 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die EU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE

Berechnungen

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

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

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

Es wird empfohlen, dass qualitative Ergebnisse, als „positiv“ oder „negativ“ berichtet werden. Probenergebnisse größer oder gleich Kalibrator D werden als positiv betrachtet.

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis E gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte. Alternativ kann eine Vier-Parameter-Kurve verwendet werden, um die Standardkurve aufzunehmen.

Es wird empfohlen, dass semiquantitative Resultate als „positiv“, „negativ“, oder „unbestimmt“ mit EU/ml Einheitswerten berichtet werden. Unbestimmte / Grenzergebnisse sollten erneut getestet und zusammen mit anderen Labormethoden bewertet werden.

Interpretation

Die Interpretationswerte wurden durch Prüfen von 64 normalen Blutspendern und Krankheitsbekämpfungsproben bestimmt. Der Cutoff wurde unter Verwendung des Mittelwerts der normalen Probanden plus 3,5 SD für GBM Ab ELISA bestimmt und einem beliebigen Wert von 20 EU/ml zugewiesen. IMMCO empfiehlt den Gebrauch des nachstehenden Referenzbereichs. Jedes Labor sollte Prüfungswerte für seine eigenen Bedingungen validieren.

GBM Ab-Wert	Interpretation
<20 EU/ml	Negativ
20–25 EU/ml	Unbestimmt (Grenzbereich)
>25 EU/ml	Positiv

Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben, die hohe Antikörperspiegel enthalten, können größere Extinktionswerte ergeben als die von Kalibrator A. Um genaue semiquantitative Werte festzulegen, sollte man solche Proben weiter verdünnen, damit sie sich innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve befinden, wenn erneut getestet wird. Um die EU/ml-Werte zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Der Test sollte nicht an stark hämolysierten, mikrobiologisch verunreinigten oder lipämischen Proben durchgeführt werden. Diese Methode sollte nur verwendet werden, um menschliche Serumproben zu testen. Die erhaltenen Resultate dienen nur als eine Hilfe bei der Diagnose. Für sich alleine genommen, sollten diese Resultate nicht als diagnostisch interpretiert werden. Das Serum von Patienten mit RPGN kann negativ für GBM-Antikörper sein. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2–8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

ERWARTETE WERTE

Bei einer normalen Population sind die Testresultate gewöhnlich als negativ zu erwarten. Studien von klinischen Populationen wurden getestet, um die positive Inzidenz für GBM-Antikörper mit diesem Test zu prüfen. Die Populationen schlossen Probanden mit dem Goodpasture-Syndrom und Autoimmunerkrankungskontrollen ein und setzten krankheitsfreie normale menschliche Probanden voraus.

Krankheit	Erwartet	n	n Pos	% Pos
Goodpasture-Syndrom	95%	65	61	93,8%
Systemischer Lupus erythematodes	<5	8	0	0,0%
Sjögren-Syndrom	<5	16	0	0,0%
Systemische Sklerose	<5	8	0	0,0%
Thyroiditis	<5	16	0	0,0%
Mischkollagenose	<5	8	0	0,0%
Rheumatoidarthritis	<5	8	0	0,0%
Zöliakie	<5	8	0	0,0%
Vasculitis	<5	8	0	0,0%
Normale Humansenen	<5	163	4	2,5%
Gesamt NHS und Krankheitskontrollen		243	4	1,6%

LEISTUNGSMERKMALE

Die Nützlichkeit des ImmuLisa™ GBM-Antikörper-ELISA wurde durch Prüfen von Goodpasture-Serumproben neben Krankheitskontrollen und „normalen“ Humansenen bewertet. Diese Proben wurden auch bei handelsüblichen Test-Kits getestet. Nur Proben im linearen Bereich der Prüfung wurden in den Methodenvergleich eingeschlossen. Die Ergebnisse sind nachstehend zusammengefasst.

A. ImmuLisa™ GBM-Antikörper-ELISA geg. anderem GBM-Antikörper-Kit:

Anderes GBM-Antikörper-ELISA		
Positiv	Negativ	Gesamt

DE

IMMCO	Positiv	42	5	47
GBM Ab	Negativ	0	79	79
ELISA	Gesamt	42	84	126

Positive Prozent-Übereinstimmung: 100% (95% CI 89,6%–100%)
Negative Prozent-Übereinstimmung: 94% (95% CI 86,0%–97,8%)
Relative Übereinstimmung: 96% (95% CI 90,5%–98,5%)

- B. Kreuzreaktivität: Insgesamt 68 der Personen mit verbundenen Bindegewebserkrankungen oder anderen potenziell kreuzreaktiven Autoimmunerkrankungen wurden ausgewählt, um auf GBM-Antikörper unter Verwendung von Immulisa™ zu testen.

Zustand	n	Positiv
Zöliakie	8	0
Hashimoto-Thyreoiditis	16	0
Rheumatoidarthritis	8	0
Sjögren-Syndrom	16	0
Systemischer Lupus erythematodes	8	0
Vasculitis	8	0
Gesamt	64	0 (0%)

Präzision

Die Präzision wurde mit 6 aus dem gesamten Bereich der Prüfung ausgewählten positiven Proben getestet. Testläufe von 6 Replikaten jeder Probe wurden in 13 Tagen durchgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde mit 12 Replikaten jeder Probe bestimmt.

S #	Gesamtungenauigkeit			Zwischen Tagen		Innerhalb des Ablaufs (Wiederholbarkeit)	
	Mittelwert (EU/ml)	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
1	12,0	1,731	14,5%	1,769	14,9%	1,521	12,9%
2	14,9	1,438	9,7%	1,461	10,0%	1,284	8,7%
3	27,0	2,536	9,4%	2,685	9,6%	1,501	5,4%
4	31,4	3,117	9,9%	3,113	10,5%	2,689	9,1%
5	106,5	4,743	4,5%	4,271	4,1%	2,914	2,8%
6	148,7	7,456	5,0%	5,902	4,1%	7,544	5,2%

Reproduzierbarkeit

Die qualitative Reproduzierbarkeit wurde mit 90 Durchläufen von Proben im negativen Bereich, ~20 % unter dem Cutoff, ~20 % über dem Cutoff und im moderaten positiven Bereich des Tests mit der Methode zur qualitativen Analyse getestet. 6 Replikate wurden in 13 Durchläufen und zusätzliche 12 Replikate wurden in einem folgenden Durchlauf im Laufe mehrerer Tage getestet. Die Ergebnisse für diese Tests ergaben 100 % qualitative (positive/negative) Übereinstimmung.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde basierend auf 60 Replikaten der Leerprobe und 10 Replikaten von je 6 Proben auf niedriger Stufe (NHS) bestimmt. LoD wurde bestimmt zu 2,4 EU/ml.

Linearität und Rückgewinnung

Die Linearität und Rückgewinnung wurden mittels Verdünnen positiver Proben im ganzen Prüfungsbereich in abstandsgleichen Verdünnungen und dem Vergleichen tatsächlicher Resultate gegenüber erwarteten Resultaten geprüft. Der lineare Bereich der Prüfung wurde bestimmt zu 2,4 (LoD) – 160 EU/ml. Die Ergebnisse sind nachstehend zusammengefasst:

Test-Bereich EU/ml	Anstieg (95% CI)	Y- Achsenabschnitt (95% CI)	R ²	% Rückgewinnung (Erhalten/Erwartet)
1,9 bis 92,3	1,01 (0,923 bis 1,105)	0,7 (-4,2 bis 5,6)	0,992	91% bis 116%
19,7 bis 108,5	1,01 (0,891 bis 1,131)	2,9 (-5,1 bis 10,9)	0,986	101% bis 117
31,1 bis 180,0	0,98 (0,889 bis 1,070)	1,2 (-9,5 bis 11,8)	0,992	92% bis 104%

DE

Interferenz

Die Interferenz wurde durch Mischen von Seren mit bekannten GBM-Antikörper-Spiegeln mit sich potenziell gegenseitig beeinflussenden Serum-Proben und der Abweichung von erwarteten Ergebnissen studiert. Keine bedeutende Interferenz wurde für die folgenden Substanzen bei den angezeigten Spiegeln demonstriert: Hämoglobin (2 g/L), Bilirubin (342 $\mu\text{mol/L}$), Rheumafaktor (100 EU/ml), Cholesterin (13 mmol/L), und Triglyceride (37 mmol/L).



ImmuLisa™

ELISA des anticorps anti-membrane basale glomérulaire (GBM)

Détection des anticorps anti-membrane basale glomérulaire (GBM)

IVD**ENCART DU PRODUIT****REF** 5154 ELISA Anticorps anti-GBM 96 tests**USAGE PRÉVU**

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA destinée à la détection qualitative et semi-quantitative des anticorps anti-membrane basale glomérulaire (GBM) dans le sérum humain, comme élément complémentaire aux conclusions cliniques et conclusions de laboratoire au cours du diagnostic des troubles rénaux auto-immuns tels que le Syndrome de Goodpasture.

RÉSUMÉ ET EXPLICATIONS

La Glomérulonéphrite proliférative est un syndrome clinique se développant sur plusieurs jours ou semaines et caractérisé par une glomérulonéphrite croissante de l'histopathologie du rein. Le pronostic est engagé si la pathologie n'est pas détectée rapidement et en l'absence de mise en place d'un traitement approprié. Pour optimiser la gestion du patient, la Glomérulonéphrite proliférative peut être classée en ayant recours à a) une évaluation clinique, b) une immunofluorescence directe et des études au microscope électronique d'une biopsie rénale et c) des études des anticorps du sérum.

A partir des critères précités, la Glomérulonéphrite proliférative peut être classée en a) maladie à médiation par les complexes immuns, caractérisée par la présence d'anticorps anti-ADN ou anti-streptococciques, b) Glomérulonéphrite et syndrome de Goodpasture à médiation par des anticorps anti-membrane basale glomérulaire et c) Glomérulonéphrite associée à des anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques (ANCA). Dans une étude de Jayne et al, sur 889 patients soupçonnés de développer un Glomérulonéphrite prolifératif, 47 (5%) présentaient des anticorps anti-GBM, 246 (28%) présentaient des anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques ANCA et 576 (65%) n'avaient aucun des deux anticorps. Deux pour cent possédaient aussi bien des anticorps ANCA et anti-GBM.¹

Les anticorps anti-GBM peuvent être détectés par immunofluorescence indirecte ou par la méthode ELISA.²⁻¹⁰ L'antigène associé aux anticorps anti-GBM est un domaine non-collagénique du collagène IV.

PRINCIPES DE LA METHODE

Le test ELISA est réalisé dans des micropuits enduits d'antigène GBM purifié. Les régulateurs, les calibreurs et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits en permettant aux anticorps anti-GBM qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner sur l'anticorps. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les micropuits des plaques. Les anticorps agglutinés sont incubés avec un conjugué d'anticorps et de marquage enzymatique pour l'IgG humain. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage des micropuits. La phosphatase alcaline et son substrat (pNPP) est ensuite ajoutée aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion du substrat vers un produit de réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration en anticorps, est mesurée par un spectrophotomètre de longueur d'onde 450 nm. Les résultats sont exprimés en unités enzyme par millilitre (EU/ml) et reportés comme positifs ou négatifs.

RDACTIFS**Stockage et préparation**

Entreposer tous les réactifs à 2°–8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20°–25°C) avant l'usage.

Quand elle est entreposée à 2°–8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration du kit. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement. Les bandes de micropuits non-utilisées doivent être rangées avec soin dans le sac contenant un gel anti-humidité pour empêcher la condensation et doivent être stockées à 2°–8°C.

Précautions

Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours

FR

être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux¹¹.

La solution d'arrêt est une solution diluée d'acide sulfurique. L'acide sulfurique (H₂SO₄) est toxique et corrosif. Ne pas ingérer et éviter tout contact avec la peau et les yeux. Éviter l'exposition aux bases, aux métaux et autres composés qui peuvent réagir avec les acides.

L'enzyme TMB contient un produit irritant qui peut être dangereux en cas d'inhalation, d'ingestion ou d'absorption par la peau. Ne pas ingérer et éviter le contact avec la peau et les yeux.

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

Matériel fourni

ImmuliSTM ELISA des anticorps MBG **REF** 5154







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

12 x 8	MICROPLATE GBM	Microplaque avec micropuits individuels séparables. Enduits d'antigène GBM. Prêt à l'usage.
1 x 1,75 ml	CONTROL + GBM	Contrôle positif (couvercle rouge) prêt à l'usage. Contient du sérum humain testé positif aux anticorps MBG. La plage de concentrations attendues en EU/ml est indiquée sur l'étiquette.
1 x 1,75 ml	CONTROL -	Contrôle négatif (couvercle blanc) prêt à l'usage. Contient du sérum humain.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A GBM CALIBRATOR B GBM CALIBRATOR C GBM CALIBRATOR D GBM CALIBRATOR E GBM	Jeu de 5 Calibrateurs prêts à l'usage. Calibrateur A (couvercle vert) 160 EU/ml, Calibrateur B (couvercle violet) 80 EU/ml, Calibrateur C (couvercle bleu) 40 EU/ml, Calibrateur D (couvercle jaune) 20 EU/ml, et Calibrateur E (couvercle orange) 1 EU/ml. Dérivé du sérum humain contenant des anticorps MBG. Les concentrations en EU/ml sont indiquées sur les étiquettes.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugué-HRP d'immunoglobine G (IgG) anti-humain de chèvre. Prêt à l'usage. Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL	Diluant pour sérum. Prêt à l'usage. Code couleur violet.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrat d'enzyme TMB. Prêt à l'usage. Conserver à l'abri de la lumière.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Solution d'arrêt*. Prêt à l'usage.
2 x vials	BUF WASH	Poudre pour tampon de lavage. Reconstituer en un litre chacun.
1 x		Fiches de protocole

Éléments optionnels

1 x 60 ml **BUF** **WASH** Concentré de liquide nettoyant. **Reconstitué en un litre.**

Symboles utilisés sur les étiquettes:

LOT	Numéro de Lot
REF	Numéro catalogue
IVD	Utilisation à diagnostic in vitro
	A utiliser avant :
	Température de stockage
	Consulter les instructions d'emploi
	Nombre de tests
	Fabricant
	Date de fabrication



*Danger. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Provoque des lésions oculaires graves. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Pipettes en mesure de délivrer 5µl à 1000 µl
- Bouchons de pipettes jetables
- Éprouvettes de test propres 12x75 mm et porte-éprouvettes de test
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 450 nm. Si un lecteur de microplaque double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600–650 nm.
- Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

RECOLTE DES SPECIMENS ET MANIPULATION

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

PROCEDURE

Notes de procédure

- Avant de commencer l'essai, il faut lire avec soin la brochure qui accompagne le produit.
- Toutes les dilutions des échantillons des patients devraient être préparées avant de commencer l'essai.
- Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test à température ambiante avant d'entreprendre la procédure de test. Il est conseillé de laisser les réactifs sur le banc d'essai pendant 30 minutes avant utilisation. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.
- **Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale.** Si le lavage est réalisé manuellement, il est fait de manière adéquate en dirigeant un flux puissant de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large à travers toute la microplaque. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 ou 12 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit avoir lieu au même taux et selon la même séquence.

Méthode de test

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

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

Étape 3 Pour une **détermination qualitative**, utiliser seulement le Calibreur Bas D prêt à l'emploi (*fiolle avec couvercle jaune*).
ou
Pour un **dosage semi-quantitatif**, utiliser les Calibreurs A à E prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.

Détermination Qualitative			Détermination Semi-Quantitative				
A	Blank	S5	Etc.	A	Blank	S1	Etc.

B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

B	-	S2	
C	+	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

- Étape 4** Préparer une dilution **1:101** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **500ul** de diluant de sérum.
- Étape 5** Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.
- Étape 6** Pipeter **100 µl** des calibres prêts à l'emploi, des régulateurs positifs et négatifs et des échantillons patients dilués dans les puits appropriés conformément au feuillet de protocole.
Note: Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif à blanc. Mettre le lecteur ELISA à zéro par rapport au réactif à blanc.
- Étape 7** Incuber pendant **30 minutes** (±5 min) à température ambiante.
- Étape 8** Laver **4x** avec de la solution de lavage. En cas de lavage manuel, remplir chaque puits avec de la solution de lavage reconstituée. Éliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Dans le cas de dispositifs automatiques de lavage, programmer le dispositif de lavage en suivant les instructions du fabricant.
- Étape 9** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.
- Étape 10** Incuber pendant **30 minutes** (±5 min) à température ambiante.
- Étape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 8.
- Étape 12** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrer comme pour le conjugué.
- Étape 13** Incuber pendant **30 minutes** (±5 min) à température ambiante.
- Étape 14** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puits, en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de **30 minutes** après l'addition de la solution d'arrêt.
- Étape 15** Lire l'absorption de chaque puits à **450 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 450/630 nm par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

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

RESULTATS

Calculs

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

1. DOSAGE QUALITATIF

$$\frac{\text{Abs. de échantillon dessai}}{\text{Abs. du calibre D}} \times \text{EU/ml du calibre D} = \text{EU/ml échantillon de test}$$

Il est recommandé que les résultats qualitatifs soient reportés comme « positifs » ou « négatifs ». Les résultats d'échantillonnage plus importants ou égaux au Calibre D seront considérés comme positifs.

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption du Calibre A à E par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire- linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe optimale. Déterminer les concentrations des échantillons de patient de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption correspondante. Sinon, une courbe à 4 paramètres peut être utilisée pour tracer la courbe standard.

FR

Il est recommandé que les résultats semi-qualitatifs soient reportés comme « positifs », « négatifs » ou « indéterminés » avec valeurs unitaires en EU/ml. Les résultats indéterminés/limites seront soumis à nouveau test et évalués selon d'autres méthodes laboratoires.

Interprétation

Des valeurs d'interprétation ont été déterminées en testant 64 donneurs de sang normaux et des spécimens de contrôle de la maladie. La limite a été établie par l'utilisation de sujets normaux plus 3,5 SD pour l'ELISA Ab MBG et avec une valeur assignée de 20 EU/ml. IMMCO suggère l'utilisation du tableau de référence ci-dessous. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Valeur Ab MBG	Interprétation des valeurs
<20 EU/ml	Négatif
20–25 EU/ml	Indéterminé (Borderline)
>25 EU/ml	Positif

Calibreur

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

LIMITES DE LA PROCEDURE

Les résultats obtenus servent seulement comme aide dans le diagnostic de la néphrite médiée par anticorps GBM et du syndrome de Goodpasture et ne devraient pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes. Le sérum de patients atteints de Glomérulonéphrite proliférative peut être négatif pour les anticorps anti-GBM. Stocker les spécimen à une température de 2–8° pour une semaine au maximum. Pour une durée de stockage plus importante, les spécimen doivent être congelés. Evitez les congélations répétées.

VALEURS ATTENDUES

Les résultats des tests sur une population normale sont généralement supposés être négatifs. Les populations cliniques ont été étudiées pour contrôler l'incidence positive des anticorps MBG dans ce test. Les populations étaient composées de patients atteints du syndrome de Goodpasture, de populations de contrôle atteints de maladie auto-immune et de patients normaux sans maladie supposée.

Maladie	Attendu	n	n Pos	% Pos
Syndrome de Goodpasture	95%	65	61	93,8%
Lupus érythémateux disséminé	<5	8	0	0,0%
Syndrome de Sjögren	<5	16	0	0,0%
Sclérodémie systémique	<5	8	0	0,0%
Thyroïdite	<5	16	0	0,0%
Connectivite mixte	<5	8	0	0,0%
Polyarthrite rhumatoïde	<5	8	0	0,0%
Maladie coeliaque	<5	8	0	0,0%
Vascularite	<5	8	0	0,0%
Sérum humain normal	<5	163	4	2,5%
Total patients malades et contrôles		243	4	1,6%

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

L'utilité de l'ELISA anticorps MBG ImmuLISA™ a été évaluée à travers le test de patients atteints du syndrome de Goodpasture ainsi que de populations de contrôle et de sérum humain « normal ». Ces éléments ont également été testés avec des kits de test disponibles dans le commerce. Seuls les patients dans la plage linéaire du test ont été inclus dans la méthode de comparaison. Les résultats sont résumés ci-dessous.

A. ELISA anticorps MBG ImmuLISA™ vs. Autre kit anticorps MBG :

		Autre ELISA anticorps MBG		
		Positif	Négatif	Total
IMMCO	Positif	42	5	47
GBM Ab	Négatif	0	79	79
ELISA	Total	42	84	126

Accord pourcentage positif :	100% (95% CI 89,6%–100%)
Accord pourcentage négatif :	94% (95% CI 86,0%–97,8%)
Accord relatif :	96% (95% CI 90,5%–98,5%)

FR

B. Réactivité croisée : un total de 68 individus possédant des désordres des tissus connectifs ou d'autres désordres auto-immunes ont été sélectionnés pour un test d'anticorps MBG via le test Immulisa.

Condition	n	Positif
Maladie coeliaque	8	0
Maladie de Hashimoto	16	0
Polyarthrite rhumatoïde	8	0
Syndrome de Sjögren	16	0
Lupus érythémateux disséminé	8	0
Vascularite	8	0
Total	64	0 (0%)

Précision

La précision a été testée sur des spécimens positifs sélectionnés dans toute la gamme de l'essai. L'essai portant sur 6 répétitions de chaque spécimen a été conduit sur 13 jours. La répétabilité a été déterminée sur 12 répétitions de chaque spécimen.

S #	Moyenne (EU/ml)	Imprécision totale		Entre jours		Entre essais (répétabilité) (Repeatability)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
1	12,0	1,731	14,5%	1,769	14,9%	1,521	12,9%
2	14,9	1,438	9,7%	1,461	10,0%	1,284	8,7%
3	27,0	2,536	9,4%	2,685	9,6%	1,501	5,4%
4	31,4	3,117	9,9%	3,113	10,5%	2,689	9,1%
5	106,5	4,743	4,5%	4,271	4,1%	2,914	2,8%
6	148,7	7,456	5,0%	5,902	4,1%	7,544	5,2%

Reproductibilité

La reproductibilité qualitative a été testée avec 90 analyses d'échantillons dans la plage négative, ~20% sous le seuil, ~20% au-dessus du seuil et dans la plage positive modérée du test, en utilisant la méthode d'analyse qualitative. 6 répétitions ont été testées au cours de 13 analyses et encore 12 répétitions ont été testées sur une analyse suivante sur plusieurs journées. Les résultats des tests ont donné un accord 100% qualitatif (positif/négatif).

Limite de détection

La limite de détection (LoD) a été déterminée sur la base de 60 duplications sur vide et de 10 répétitions, chacune sur des échantillons de 6 niveaux faibles (NHS). La LoD a été déterminée comme étant de 2,4 EU/ml.

Linéarité et récupération

La linéarité et la récupération ont été testées en diluant des spécimens positifs dans la gamme de l'essai et dilutions équidistantes et en comparant les résultats reconnus aux résultats attendus. La gamme linéaire de l'essai a été déterminée comme étant de 2,4 (LoD) – 160 EU/ml. Les résultats sont résumés ci-dessous :

Gamme de test (EU/ml)	Pente (95% CI)	Intercept-Y (95% CI)	R ²	% récupération (obtenu/attendu)
1,9 à 92,3	1,01 (,923 à 1,105)	0,7 (-4,2 à 5,6)	0,992	91% à 116%
19,7 à 108,5	1,01 (,891 à 1,131)	2,9 (-5,1 à 10,9)	0,986	101% à 117
31,1 à 180,0	0,98 (,889 à 1,070)	1,2 (-9,5 à 11,8)	0,992	92% à 104%

Interférence

L'interférence a été étudiée en mélangeant du sérum avec des niveaux d'anticorps MBG connus avec des échantillons de sérum pouvant potentiellement interférer et en étudiant les déviations depuis les résultats attendus. Aucune interférence significative n'a pu être démontrée pour les substances suivantes aux niveaux indiqués : hémoglobine (2 g/l), bilirubine (342 µmol/L), facteur rhumatoïde (100 EU/ml), cholestérol (13 mmol/L) et triglycérides (37 mmol/L).

ImmuLisa™

Test anticorpi GBM ELISA

Rilevazione di anticorpi con membrana basale glomerulare (GBM)

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 5154 Test anticorpi GBM ELISA 96 Determinazioni

FINALITÀ D'USO

Un enzima collegato al test immunoassorbente (ELISA) per la rilevazione qualitativo o semiquantitativo di membrana basale glomerulare (GBM) nel siero umano come strumento di aiuto nella diagnosi di disordini renali autoimmuni come la sindrome di Goodpasture in connessione con altre scoperte di laboratorio e cliniche.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La glomerulonefrite rapidamente progressiva (RPGN) è una sindrome clinica che si sviluppa in giorni o settimane caratterizzata da glomerulonefrite crescente sull'istopatologia del rene. La prognosi è scarsa se non riconosciuta in tempo e se non viene applicato subito un trattamento appropriato. Per ottimizzare la gestione del paziente, la RPGN può essere classificata in base a) alla valutazione clinica, b) all'immunofluorescenza diretta e agli studi microscopici degli elettroni di biopsia renale e c) agli studi di anticorpi di siero.

Usando i criteri di cui sopra, la RPGN può essere classificata come a) complessa malattia mediata caratterizzata dalla presenza di anticorpi anti-DNA o anticorpi anti-streptococco, b) glomerulonefrite mediata con membrana basale anti-glomerulare (GBM) e sindrome di Goodpasture e c) glomerulonefrite associata ad anticorpi citoplasmatici anti-neutrofili (ANCA). In uno studio redatto da Jayne et al su 889 pazienti sospetti di RPGN, 47 (5%) presentava anticorpi anti-GBM, 246 (28%) anticorpi ANCA e 576 (65%) non presentavano anticorpi. Il due per cento presentava sia anticorpi ANCA che anticorpi anti-GBM.¹

Gli anticorpi anti-GBM possono essere rilevati da immunofluorescenza indiretta o dal test ELISA.²⁻¹⁰ L'antigene associato agli anticorpi anti-GBM è un dominio non-collagene di collagene IV.

PRINCIPI DELLA METODICA

Il test viene eseguito come test immunoenzimatico in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con l'antigene GBM purificato; segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, e ciò permette agli ASCA presenti nel siero di legarsi. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati sono rilevati da un coniugato anti IgG marcato con un enzima aggiunto ai pozzetti. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi viene rivelata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato in un derivato colorato della reazione. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 450 nm. I risultati sono espressi in unità di enzima per millimetro (EU/ml) e riportati come positivi o negativi.

REAGENTI

CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE

Conservare tutti i reagenti a 2–8°C. **Non congelare.** I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e gestiti come indicato.

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

Se conservato a 2–8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata.

Le strisce con i pozzetti sono monouso. Riporre le strisce con i pozzetti inutilizzate nella busta di confezionamento dove sono presenti dissecanti e sigillare per minimizzare l'esposizione a vapore acqueo e conservarle a 2–8°C.

IT

Precauzioni

Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali.¹¹

La soluzione di Stop è una soluzione diluita a base di acido solforico. L'acido solforico (H₂SO₄) è tossico e corrosivo. Non ingerirlo ed evitare il contatto con pelle e occhi. Evitare l'esposizione a basi, metalli o altri componenti che potrebbero reagire agli acidi.

Il substrato enzimatico TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Non ingerire ed evitare il contatto con cute e occhi.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Usare tecniche di laboratorio idonee per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Materiali forniti

Test ELISA di anticorpi GBM ImmuLISA™

REF 5154







I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Micropiastra con micropozzetti singoli di separazione. Rivestiti con antigene GBM. Pronto per l'uso.
1 x 1,75 ml	CONTROL + GBM	Controllo positivo pronto per l'uso (tappo rosso). Contiene siero umano positive per anticorpi GBM. L'intervallo di concentrazione previsto in EU/ml è stampato sull'etichetta.
1 x 1,75 ml	CONTROL -	Controllo negativo pronto per l'uso (tappo bianco). Contiene siero umano.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A GBM CALIBRATOR B GBM CALIBRATOR C GBM CALIBRATOR D GBM CALIBRATOR E GBM	Set pronto per l'uso di 5 Calibratori . Calibratore A (tappo verde) 160 EU/ml, Calibratore B (tappo viola) 80 EU/ml, Calibratore C (tappo blu) 40 EU/ml, Calibratore D (tappo giallo) 20 EU/ml, e Calibratore E (tappo arancione) 1 EU/ml. Derivato da siero umano contenente anticorpi GBM. Le concentrazioni in EU/ml sono stampate sull'etichetta.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Coniugato IgG anti-umano di capra HRP. Pronto per l'uso. Colore rosa.
1 x 60 ml	DIL	Diluyente siero. Pronto per l'uso. Colore porpora.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrato enzimatico TMB. Pronto per l'uso. Proteggere dalla luce.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Soluzione di Stop*. Pronta all'uso.
2 x fiale	BUF WASH	Tampone di lavaggio in polvere. Da ricostruire di 1 litro ciascuno.
1 x		Fogli protocollo

Componenti opzionali

1 x 60 ml **BUF** **WASH** Liquido concentrato Wash Buffer. **Ricostituire a un litro ciascuno.**

Simboli usati sulle etichette:

LOT	Codice del lotto
REF	Numero di catalogo
IVD	Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Utilizzare entro
	Temperatura di conservazione
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Numero di test
	Fabbricante
	Data di fabbricazione



*Pericolo. Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Provoca gravi lesioni oculari. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:** sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito
- Pipette con capacità di dispensazione 5 µl to 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 450 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600–650 nm
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

RACCOLTA DEL CAMPIONE

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

PROCEDURA

Note sul test

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. Si consiglia di poggiare i reagenti fuori dalla confezione per 30 minuti prima dell'uso. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.
- **Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva.** Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastro. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastro.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 o 12 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e il tempo di incubazione più uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta dei reagenti.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.

Metodo del test

Fase 1 Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.

Fase 2 Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. È buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.

Fase 3 Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Calibratore D pronto all'uso (*fiala con tappo giallo*)

mentre

per una **determinazione semi-quantitativa** usare i Calibratori da A ad E pronti all'uso come illustrato nell'esempio di disposizione riportato sotto.

**Determinazione
qualitativa**

**Determinazione
semiquantitativa**

IT

A	Blank	S5	Etc.
B	-	S6	
C	+	S7	
D	Cal D	S8	
E	S1	S9	
F	S2	S10	
G	S3	S11	
H	S4	S12	
	1	2	3

A	Blank	S1	Etc.
B	-	S2	
C	+	S3	
D	Cal A	S4	
E	Cal B	S5	
F	Cal C	S6	
G	Cal D	S7	
H	Cal E	S8	
	1	2	3

- Fase 4** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **500 µl** di Diluente del Siero.
- Fase 5** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.
- Fase 6** Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente (**1:101**) negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.
- Nota:** Includere un pozzetto contenente 100 µl di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco.
- Fase 7** Incubare per **30 minuti** (±5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 9** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** (±5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 8.
- Fase 12** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** (±5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 14** Pipettare **100 µl** di Soluzione di stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro **30 minuti** dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Fase 15** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **450 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (450/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere <0,3. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore <10 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le EU/ml si deve prendere la media delle due letture. Se si eseguono le determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore dell'assorbanza del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

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

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

$$\frac{\text{Assorbanza del campione del test}}{\text{Assorbanza del calibratore D}} \times \text{EU/ml del Calibratore D} = \text{EU/ml del Campione}$$

Si consiglia di riportare i risultati qualitative in "positivi" o "negativi." I risultati dei campioni maggiori di o uguali al Calibratore D sono considerati positivi.

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A ad E contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le

IT

concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza. Alternativamente, usare una curva con quattro parametri per tracciare la curva standard.

Si consiglia di riportare i risultati semiquantitativi in "positivi," "negativi" o "indeterminati" con valori EU/ml. I risultati indeterminati/ milite devono essere testate di nuovo e valutati con altri metodi di laboratorio.

Interpretazione

I valori illustrati sono stati determinati analizzando 64 campioni di sieri da donatori di sangue normali. Il limite è stato stabilito usando soggetti normali + 3.5 SD per GBM Ab ELISA ed è stato loro assegnato un valore arbitrario di 20 EU/ml. IMMCO suggerisce l'uso dell'intervallo di riferimento di seguito. Ogni laboratorio deve convalidare i valori del test per le proprie condizioni.

Valore GBM Ab	Interpretazione
<20 EU/ml	Negativo
20–25 EU/ml	Indeterminato (Borderline)
>25 EU/ml	Positivo

Calibratore

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

LIMITAZIONI DEL TEST

Il test non deve essere eseguito su campioni fortemente emolizzati, microbiologicamente contaminate lipemici o itterici. Questa metodica deve essere usata per testare solo campioni di siero umano. I risultati ottenuti rappresentano unicamente un elemento di supporto alla diagnosi. Considerati singolarmente non hanno valenza diagnostica. I sieri di alcuni pazienti con RPGN possono risultare negativi agli anticorpi anti-GBM. Conservare i campioni a 2–8°C per non più di una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

VALORI ATTESI

I valori attesi in una popolazione normale sono negativi. Studi di popolazioni cliniche sono stati testate per mostrare incidenza positive per gli anticorpi GBM con questo test. Le popolazioni comprendono soggetti affetti dalla sindrome di Goodpasture, controlli di malattie autoimmuni e soggetti umani normali senza presunte malattie.

Patologia	Prevista	n	n Pos	% Pos
Sindrome di Goodpasture	95%	65	61	93,8%
Lupus eritematoso sistemico	<5	8	0	0,0%
Sindrome di Sjögren	<5	16	0	0,0%
Sclerosi sistemica	<5	8	0	0,0%
Tiroidite	<5	16	0	0,0%
Tessuto connettivo misto	<5	8	0	0,0%
Artrite reumatoide	<5	8	0	0,0%
Malattia celiaca	<5	8	0	0,0%
Vasculite	<5	8	0	0,0%
Siero umano normale	<5	163	4	2,5%
Controlli totali NHS e patologie		243	4	1,6%

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

L'utilità del test di anticorpi GBM ELISA Immulisa™ è stato valutato testando campioni di Goodpasture con controlli della patologia e siero umano "normale". Questi campioni sono stati anche testate con kit di analisi disponibili in commercio. Solo campioni nell'intervallo lineare del test sono stati inclusi nel confronto della metodologia. Questi risultati sono riassunti di seguito.

A. Test ELISA di anticorpi GBM Immulisa™ vs. altro kit anticorpi GBM:

		Altro test ELISA anticorpi GBM		
		Positivo	Negativo	Totale
IMMCO	Positivo	42	5	47
GBM Ab	Negativo	0	79	79
ELISA	Totale	42	84	126

Accordo percentuale positiva:	100% (95% CI 89,6%–100%)
Accordo percentuale negativa:	94% (95% CI 86,0%–97,8%)
Accordo relativo:	96% (95% CI 90,5%–98,5%)

IT

B. Reattività incrociata: un totale di 68 individui con disordini del tessuto connettivo associato o altri disordini autoimmune con reattività incrociata sono stati selezionati per analizzare gli anticorpi GBM usando il test Immulisa™.

Condizione	n	Positiva
Malattia celiaca	8	0
Malattia di Hashimoto	16	0
Artite reumatoide	8	0
Sindrome di Sjögren	16	0
Lupus eritematoso sistemico	8	0
Vasculite	8	0
Totale	64	0 (0%)

Precisione

La precisione è stata analizzata con campioni positive selezionati nell'intervallo del test. Test di 6 replicati di ogni campione sono stati eseguiti

S n.	Sostanza (EU/ml)	Imprecisione totale		Tra giorni		In test (ripetibilità)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
1	12,0	1,731	14,5%	1,769	14,9%	1,521	12,9%
2	14,9	1,438	9,7%	1,461	10,0%	1,284	8,7%
3	27,0	2,536	9,4%	2,685	9,6%	1,501	5,4%
4	31,4	3,117	9,9%	3,113	10,5%	2,689	9,1%
5	106,5	4,743	4,5%	4,271	4,1%	2,914	2,8%
6	148,7	7,456	5,0%	5,902	4,1%	7,544	5,2%

Riproducibilità

La riproducibilità qualitative è stata analizzata con 90 sessioni di campioni nell'intervallo negativo, ~20% sotto al limite, ~20% sopra al limite e nell'intervallo positivo moderato del test usando il metodo di analisi qualitativa. 6 replicati sono stati analizzati in 13 sessioni e altri 12 replicati sono stati analizzati in una sessione successive in diversi giorni. I risultati del test hanno prodotto un accordo qualitative al 100% (positivo/negativo).

Limite di rilevazione

Il limite di rilevazione (LoD) è stato determinate in base a 60 replicati di vuoto e 10 replicati ognuno di 6 campioni di livello basso (NHS). LoD è risultato essere 2,4 EU/ml.

Linearità e ripresa

La linearità e ripresa sono state testate diluendo campioni positivi tramite l'intervallo di analisi in diluizioni equidistanti e confrontando risultati reali e previsti. L'intervallo lineare del test è risultato 2,4 (LoD) – 160 EU/ml. I risultati sono riassunti di seguito:

Intervallo di analisi (EU/ml)	Inclinazione (95% CI)	Segmento Y (95% CI)	R ²	% ripresa (ottenuta/prevista)
Da 1,9 a 92,3	1,01 (da ,923 a 1,105)	0,7 (da -4,2 a 5,6)	0,992	Da 91% a 116%
Da 19,7 a 108,5	1,01 (da ,891 a 1,131)	2,9 (da -5,1 a 10,9)	0,986	Da 101% a 117
Da 31,1 a 180,0	0,98 (da ,889 a 1,070)	1,2 (da -9,5 a 11,8)	0,992	Da 92% a 104%

Interferenza

L'interferenza è stata studiata mischiando sieri con livelli di anticorpi GBM conosciuti con campioni di siero potenzialmente interferente e studiando la deviazione dai risultati previsti. Nessuna interferenza significativa è stata dimostrata per le seguenti sostanze ai livelli indicate: emoglobina (2 g/L), bilirubina (342 µmol/L), fattore reumatoide (100 EU/ml), colesterolo (13 mmol/L), e trigliceridi (37 mmol/L).



ImmuliTM

ELISA para Anticorpos Anti-GBM

Deteção de anticorpos da membrana basal glomerular

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 5154 ELISA para Anticorpos Anti-GBM 96 Determinações

APLICAÇÃO

Um teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a deteção qualitativa ou semi-quantitativa de anticorpos anti-membrana basal glomerular (GBM) em soro humano para o diagnóstico de doenças renais autoimunes, tais como a síndrome de Goodpasture em conjunto com as conclusões clínicas e outros testes laboratoriais.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

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

Usando os critérios acima mencionados, a GNRP poderá ser classificada como a) doença mediada por complexos imunes caracterizada pela presença de anticorpos anti-ADN ou anticorpos anti-estreptococos, b) glomerulonefrite mediada por anticorpo anti-membrana basal glomerular (GBM) e Síndrome de Goodpasture e c) glomerulonefrite associada a anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA). Num estudo de Jayne et al, de 889 pacientes suspeitos de GNRP, 47 (5%) tinham anticorpos anti-GBM, 246 (28%) tinham ANCA e 576 (65%) não tinham nenhuns anticorpos. Dois por cento tinham ambos os anticorpos ANCA e anti-GBM.¹

Os anticorpos Anti-GBM podem ser detetados por imunofluorescência indireta ou por ELISA.²⁻¹⁰ O antígeno associado aos anticorpos anti-GBM é um domínio não-colagénico do colágeno IV.

PRINCÍPIOS DO MÉTODO

Este teste é realizado como imunoensaio de fase sólida. Os micropoços são revestidos com antígeno GBM purificado, seguido por um passo bloqueador para reduzir a ligação da proteína não específica durante a realização do ensaio. Os controlos, os calibradores e as amostras de soro do doente são incubados nos micropoços, permitindo que os anticorpos específicos presentes no soro se liguem ao antígeno. Os anticorpos que não se ligam e as outras proteínas do soro são eliminados lavando os micropoços. Os anticorpos ligados são detetados pela adição de um conjugado de IgG anti-humana marcado com enzima aos micropoços. O conjugado que não tiver aderido é eliminado lavando os micropoços. Depois junta-se um substrato enzimático específico (TMB) aos micropoços e a presença de anticorpos é detetada por uma mudança de cor provocada pela conversão do substrato TMB num produto de reação, colorido. A reação é interrompida e muda a intensidade da cor, a qual será proporcional à concentração de anticorpos, lida por um espectrofotómetro a 450 nm. Os resultados são indicados em Unidades de Enzima por mililitros (UE/ml) e comunicados como positivos ou negativos.

REAGENTES

Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8°C. **Não congele.** Os reagentes permanecerão estáveis até à data de validade, quando armazenados e manuseados conforme indicado.

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

Reconstitua o tampão de lavagem em 1 litro com água destilada ou desionizada. Quando conservado entre 2 e 8°C, o tampão de lavagem reconstituído permanecerá estável até à data de validade do kit.

As tiras de micropoços revestidos só devem ser usadas uma vez. As tiras de micropoços não utilizadas devem ser cuidadosamente novamente seladas na bolsa que contém os dessecantes a fim de prevenir a condensação e armazenadas entre 2 a 8°C.

PT

Precauções

Todos os componentes de origem humana usados foram testados para HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo pelos testes exigidos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e as amostras dos doentes devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Respeite as normas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação desses materiais.¹¹

A solução de paragem consiste numa solução de ácido sulfúrico diluído. O ácido sulfúrico (H₂SO₄) é venenoso e corrosivo. Não ingerir e evitar o contacto com a pele e olhos. Evitar a exposição a bases, metais ou outros compostos que possam reagir com os ácidos.

O Substrato Enzimático TMB contém um irritante que pode ser prejudicial se for inalado, ingerido ou absorvido pela pele. Não ingerir e evitar o contacto com a pele e olhos.

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

Materiais fornecidos

ELISA para Anticorpos Anti-GBM ImmuLisa™ **REF** 5154





Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8	MICROPLATE GBM	Microplaca com micropoços individuais separados. Revestida com antígeno GBM. Pronta a utilizar.
1 x 1,75 ml	CONTROL + GBM	Controlo Positivo (tampa vermelha) pronto a utilizar. Contém soro humano positivo para anticorpos GBM. A faixa de concentração esperada em UE/ml está impressa na etiqueta.
1 x 1,75 ml	CONTROL -	Controlo Negativo pronto a utilizar (tampa branca). Contém soro humano.
5 x 1,75 ml	CALIBRATOR A GBM CALIBRATOR B GBM CALIBRATOR C GBM CALIBRATOR D GBM CALIBRATOR E GBM	Conjunto de 5 Calibradores prontos a utilizar. Calibrador A (tampa verde) 160 EU/ml, Calibrador B (tampa violeta) 80 EU/ml, Calibrador C (tampa azul) 40 EU/ml, Calibrador D (tampa amarela) 20 EU/ml, e Calibrador E (tampa laranja) 1 EU/ml. Derivado do soro humano contendo anticorpos GBM. As concentrações em UE/ml estão impressas nas etiquetas.
1 x 15 ml	IgG-CONJ HRP	Conjugado HRP de cabra IgG anti-humano. Pronto a utilizar. Código de cor rosa.
1 x 60 ml	DIL	Diluinte de Soro. Pronto a utilizar. Código de cor púrpura.
1 x 15 ml	SUBSTRATE TMB	Substrato enzimático TMB. Pronto a utilizar. Proteger da luz.
1 x 15 ml	STOP H2SO4	Solução de Paragem*. Pronto a utilizar.
2 x ampolas	BUF WASH	Tampão de Lavagem de Pó. Reconstituir para um litro cada.
1 x		Folhas de Protocolo

Componentes Opcionais

1 x 60 ml **BUF** **WASH** Tampão de Lavagem líquido concentrado. **Reconstituir para um litro.**

Símbolos utilizados nos rótulos:

LOT	Número de lote
REF	Número de catálogo
IVD	Utilização diagnóstica <i>in vitro</i>
	Utilização por
	Temperatura de armazenamento
	Consulte as instruções de utilização
	Número de testes



Fabricante



Data de fabricação



*Perigo. Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Provoca lesões oculares graves. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/protecção ocular/protecção facial. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

Materiais necessários mas não fornecidos

- Água desionizada ou destilada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Pipetas com capacidade de libertação de 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubo de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorvente
- Leitor de microplacas capaz de ler valores de absorvância a 450 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado em 600–650 nm
- Lavador automático de microplacas capaz de distribuir 200 µl

COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Só devem ser usadas amostras de soro neste método. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com contaminação microbiana podem interferir com o desempenho do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras entre 2° a 8°C por não mais de uma semana. Para uma conservação mais prolongada, as amostras de soro devem ser congeladas. Evite congelar e descongelar as amostras repetidamente. Recomenda-se que as amostras congeladas sejam testadas no prazo de um ano.

PROCEDIMENTO

Notas sobre o procedimento

- Antes de iniciar o teste leia atentamente o folheto do produto.
- Todas as diluições das amostras dos pacientes devem ser preparadas antes de iniciar o ensaio.
- Deixe que as amostras dos pacientes e os reagentes de teste alcancem a temperatura ambiente antes de iniciar o teste. Sugere-se que antes de serem utilizados os reagentes sejam deixados na bancada e fora da caixa durante 30 minutos. Guarde imediatamente no frigorífico as amostras e os reagentes não usados.
- Retire as tiras de micropoços necessárias do pacote e depois feche-as bem para evitar a condensação nos poços não usados. Guarde o pacote imediatamente no frigorífico.
- **É fundamental uma boa técnica de lavagem.** Se a lavagem for efetuada manualmente, a melhor forma de efetuar essa lavagem é deitar um forte fluxo do tampão de lavagem com um frasco de lavagem de boca larga ao longo de toda a microplaca. **Aconselha-se o uso de um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal capaz de distribuir em 8 ou 12 poços simultaneamente. Isso torna o processo mais rápido e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante um controlo do tempo. O início de todos os períodos de incubação dá-se quando se adiciona o reagente.
- O adicionamento de todas as amostras e reagentes deve ser efetuado com o mesmo intervalo e na mesma sequência.

Método do Teste

Passo 1 Deixe que todos os reagentes e as amostras dos doentes alcancem a temperatura ambiente.

Passo 2 Preencha a folha de protocolo para indicar a disposição das amostras nos poços. É laboratorialmente aconselhável processar as amostras em duplicado.

Passo 3 Para uma **determinação qualitativa** use exclusivamente o Calibrador D (*frasco com a tampa amarela*).

ou

Para uma **determinação semi-quantitativa** use os Calibradores A a E, como descrito no esquema das amostras abaixo.

Qualitativa				Determinação Semi-Quantitativa			
A	Branco	S5	Etc.	A	Branco	S1	Etc.
B	-	S6		B	-	S2	
C	+	S7		C	+	S3	
D	Cal D	S8		D	Cal A	S4	
E	S1	S9		E	Cal B	S5	
F	S2	S10		F	Cal C	S6	
G	S3	S11		G	Cal D	S7	
H	S4	S12		H	Cal E	S8	
	1	2	3		1	2	3

- Passo 4** Prepare uma diluição a **1:101** das amostras do doente, misturando **5 µl** de soro do doente com **500 µl** de Diluente do Soro.
- Passo 5** Retire os micropoços necessários do pacote e guarde as tiras não utilizadas no pacote fechado dentro do frigorífico. Coloque corretamente os micropoços no suporte extra fornecido.
- Passo 6** Deite com uma pipeta **100 µl** de Calibradores prontos a usar, Controlo Positivo e Negativo e amostras dos doentes diluídas (**1:101**) nos micropoços respetivos como indicado na folha de protocolo.
Nota: Inclua um poço que contenha **100 µl** de Diluente de Soro como branco de reagente. Determine o zero do leitor ELISA em relação ao branco de reagente.
- Passo 7** Incube **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 8** Lave **4x** com tampão de lavagem. Em caso de lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido invertendo e sacudindo o conteúdo de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para enxugar após a última lavagem, inverta as tiras e sacuda vigorosamente em toalhetes de papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.
- Passo 9** Deite com uma pipeta **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- Passo 10** Incube **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 11** Lave todos os micropoços como indicado no Passo 8.
- Passo 12** Deite com uma pipeta **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempo usados para o Conjugado.
- Passo 13** Incube **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 14** Deite com uma pipeta **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço, na mesma ordem e tempos usados na junção do Substrato Enzimático. Leia os valores de absorvância no prazo de 30 minutos após ter juntado a solução de paragem.
- Passo 15** Leia a absorvância de cada micropoço a **450 nm** usando um leitor de microplacas de comprimento de onda duplo a 450/630 em relação ao branco de reagente definido em absorvância zero.

Controlo de Qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o branco de reagente devem ser executados em cada teste para verificar a integridade e a precisão desse teste. A leitura de absorvância do branco de reagente deve ser $<0,3$. O calibrador deve ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário, deve-se repetir o teste. O controlo negativo deve ser <10 UE/ml. Se o teste for efetuado em duplicado, deve-se calcular a média das duas leituras para determinar as UE/ml. Quando se efetuam as determinações qualitativas, a densidade ótica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Nas determinações semi-quantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado no frasco.

RESULTADOS

Cálculos

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

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

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

É aconselhável que os resultados qualitativos sejam reportados como "positivos" ou "negativos". Os resultados das amostras que forem superiores ou iguais aos do Calibrador D são considerados positivos.

2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

PT

Registe a absorvância do Calibrador A ao E em relação às respetivas concentrações num papel milimétrico linear. Registe a concentração em UE/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e trace a curva mais lógica. Determine as concentrações das amostras dos doentes pela curva em relação ao seu valor de absorvância correspondente. Em alternativa, pode ser utilizada uma curva de quatro parâmetros para traçar a curva padrão.

Recomenda-se que os resultados semi-quantitativos sejam comunicados como “positivos,” “negativos,” ou “indeterminados” com valores unitários de UE/ml. Os resultados indeterminados/linha divisória devem ser novamente testados e avaliados a par de outros métodos laboratoriais.

Interpretação

Os valores de interpretação foram determinados, testando 64 dadores de sangue normal e amostras de controlo de doenças. A média dos indivíduos normais mais 3,5 SD foi estabelecida como o corte do ensaio para GBM Ab ELISA e foi atribuído um valor arbitrário de 20 UE/ml. A IMMCO sugere a utilização da série de referência seguinte. Cada laboratório deve validar valores de ensaio para as suas próprias condições.

Valor GBM Ab	Interpretação
<20 EU/ml	Negativo
20–25 EU/ml	Indeterminado (Linha divisória)
>25 EU/ml	Positivo

Calibrador

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

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

O ensaio não deve ser realizado em amostras excessivamente hemolizadas, contaminadas microbiologicamente ou lipémicas. Este método deve ser exclusivamente utilizado para testar amostras de soro humano. Os resultados obtidos servem unicamente como ajuda ao diagnóstico. Caso sejam considerados isoladamente, estes resultados não devem ser interpretados como um diagnóstico. O soro dos pacientes com GNRP pode ser negativo para anticorpos GBM. Armazene as amostras a uma temperatura entre 2ª a 8º C durante o máximo de uma semana. Para uma conservação mais prolongada, as amostras de soro devem ser congeladas. Evite congelar e descongelar as amostras repetidamente.

VALORES PREVISTOS

Espera-se que os resultados do teste numa população normal sejam negativos. Foram testados estudos de populações clínicas para realizar o levantamento da incidência positiva para os anticorpos GBM com este teste. As populações incluíam indivíduos com a síndrome de Goodpasture, controlos de doenças autoimunes e indivíduos normais presumivelmente sem doenças.

Doença	Previsto	n	n Pos	% Pos
Síndrome de Goodpasture	95%	65	61	93,8%
Lupus eritematoso sistémico	<5	8	0	0,0%
Síndrome de Sjögren	<5	16	0	0,0%
Esclerose sistémica	<5	8	0	0,0%
Tireoidite	<5	16	0	0,0%
Doença mista do tecido conjuntivo	<5	8	0	0,0%
Artrite Reumatoide	<5	8	0	0,0%
Doença Celíaca	<5	8	0	0,0%
Vasculite	<5	8	0	0,0%
Soro Humano Normal	<5	163	4	2,5%
Total NHS e Controlos de Doenças		243	4	1,6%

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A utilidade do ELISA para Anticorpos Anti-GBM ImmuLISA™ foi avaliada ao testar amostras de Goodpasture a par de controlos de doenças e soro humano “normal”. Estas amostras também foram testadas em kits de teste comercialmente disponíveis. Só foram incluídas no método comparativo as amostras da faixa linear do ensaio. Os resultados são seguidamente resumidos.

A. ELISA para Anticorpos Anti-GBM ImmuLISA™ vs. outro kit de anticorpos anti-GBM:

		Outro Anticorpo Anti-GBM ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
IMMCO	Positivo	42	5	47
GBM Ab	Negativo	0	79	79

PT

ELISA	Total	42	84	126
--------------	-------	----	----	-----

Acordo Percentual Positivo: 100% (95% CI 89,6%–100%)
 Acordo Percentual Negativo: 94% (95% CI 86,0%–97,8%)
 Acordo Relativo: 96% (95% CI 90,5%–98,5%)

B. Reatividade Cruzada: Foram selecionados um total de 68 indivíduos com doenças do tecido conjuntivo associadas ou outras doenças autoimunes potencialmente com reatividade cruzada para testar os anticorpos GBM utilizando o teste ImmuLisa™.

Doença	n	Positivo
Doença Celíaca	8	0
Doença de Hashimoto	16	0
Artrite Reumatoide	8	0
Síndrome de Sjögren	16	0
Lupus eritematoso sistêmico	8	0
Vasculite	8	0
Total	64	0 (0%)

Precisão

A precisão foi testada com amostras positivas selecionadas ao longo de todo o intervalo do ensaio. Foram conduzidos ensaios a 6 réplicas de cada amostra durante 13 dias. A repetibilidade foi determinada com 12 réplicas de cada amostra.

S #	Média (EU/ml)	Imprecisão Total		Entre dias		No ensaio (Repetibilidade)	
		SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%	SD (EU/ml)	CV%
1	12,0	1,731	14,5%	1,769	14,9%	1,521	12,9%
2	14,9	1,438	9,7%	1,461	10,0%	1,284	8,7%
3	27,0	2,536	9,4%	2,685	9,6%	1,501	5,4%
4	31,4	3,117	9,9%	3,113	10,5%	2,689	9,1%
5	106,5	4,743	4,5%	4,271	4,1%	2,914	2,8%
6	148,7	7,456	5,0%	5,902	4,1%	7,544	5,2%

Reprodutibilidade

Foram realizadas noventa ensaios de amostras na série negativa, ~20% abaixo do corte, ~20% acima do corte e na série positiva moderada do ensaio, para determinar a reprodutibilidade qualitativa através do método de análise qualitativa. Foram testadas 6 réplicas em 13 ensaios e foram adicionalmente testadas 12 réplicas num ensaio seguinte ao longo de vários dias. Os resultados do ensaio para estes testes produziram 100% de concordância qualitativa (positiva/negativa).

Limite de Detecção

O limite de detecção (LoD) foi determinado com base em 60 réplicas das amostras em branco e em 10 réplicas de cada uma das amostras de 6 de baixo nível (NHS). O LoD foi determinado como sendo 2,4 UE/ml.

Linearidade e Recuperação

A linearidade e a recuperação foram testadas mediante diluição das amostras positivas através da série de ensaio em diluições equidistantes e comparando os resultados atuais e previstos. A série linear do ensaio foi determinada como 2,4 (LoD) – 160 UE/ml. Os resultados são seguidamente resumidos:

Intervalo de Teste (EU/ml)	Desvio (95% CI)	Interceção-Y (95% CI)	R ²	% recuperação (obtida/prevista)
1,9 a 92,3	1,01 (0,923 a 1,105)	0,7 (-4,2 a 5,6)	0,992	91% a 116%
19,7 a 108,5	1,01 (0,891 a 1,131)	2,9 (-5,1 a 10,9)	0,986	101% a 117
31,1 a 180,0	0,98 (0,889 a 1,070)	1,2 (-9,5 a 11,8)	0,992	92% a 104%

Interferência

A interferência foi estudada misturando o soro com níveis conhecidos de anticorpos GBM com amostras de soro potencialmente interferentes e estudando o desvio dos resultados previstos. Não foi demonstrada interferência significativa para as substâncias seguintes nos níveis indicados: hemoglobina (2 g/L), Bilirrubina (342 µmol/L), fator reumatoide (100 UE/ml), colesterol (13 mmol/L) e triglicéridos (37 mmol/L).

REFERENCES • ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ • BIBLIOGRAFÍA • REFERENZEN • REFERENCES • BIBLIOGRAFIA • REFERÊNCIAS

1. Jayne DRW, Marshall PD, Jones SJ and Lockwood CM. Autoantibodies to GBM and neutrophil cytoplasm in rapidly progressive glomerulonephritis. *Kidney Int*; 1990, 37:965-970.
2. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J. Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med*. 1995. 238:143-152.
3. Wieslander J, Bygren P, Heinegård D. Anti-basement membrane antibody: Immunoenzymatic assay and specificity of antibodies. *Scand J Clin Lab Invest*. 1981. 41:763-772.
4. Butkowski R, Langeveld J, Wieslander J, Hamilton J, Hudson BG. Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen. *J Biol Chem*, 1987; 262:7874-7877.
5. Hellmark T, Johansson C, Wieslander J. Characterization of anti-GBM antibodies involved in Goodpasture's Syndrome. *Kidney Int*. 1994. 46:823-829.
6. Segelmark M, Butkowski R, Wieslander J. Antigen restriction and IgG subclasses among anti-GBM autoantibodies. *Nephrol Dial Transplant*. 1990. 5:991-996.
7. Wieslander J, Bygren P, Heinegård D. Isolation of the specific glomerular basement membrane antigen involved in Goodpasture Syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984. 81:1544-1548.
8. Wieslander J, Barr JF, Butkowski RJ, Edwards SJ, Bygren P, Heinegård D, and Hudson BG. Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: localization to noncollagenous regions of type IV collagen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 81:3838-3842.
9. Hudson BG, Wieslander J, Wisdom B, Noelken ME. Biology of disease. Goodpasture Syndrome: Molecular architecture and function of the basement membrane antigen. *Lab Invest*. 1989. 61:256-269.
10. Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K. Type IV collagen: Structure, gene organization, and role in human disease. *J Biol Chem*. 1993. 268:26033-26036.
11. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health. 2007; (HHS Pub No [CDC] 93-8395)

For technical assistance please contact:



 **IMMCO Diagnostics, Inc.**
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120 USA
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

Rev. APR2017

Document No. PI5154