

Instruction

WIESLAB[®] Anti-GBM semi quantitative kit (Goodpasture syndrome)

Enzyme immunoassay for detection of autoantibodies
against glomerular basement membrane

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



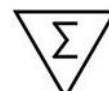
Document No. E-23-0165-07
May, 2015

WIESLAB[®] Anti-GBM semi quantitative kit (Goodpasture syndrome)

English:	page	2
Français:	page	12
Español:	page	23
Deutsch:	seite.....	30
Italiano:	pagina	37
Português	pagina	44
Dansk:	side.....	51
Norsk:	side.....	57
Svenska:	sida.....	64

REF GP 104X

IVD



INTENDED USE

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

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

Summary and explanation

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

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

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

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

Principle of the Wieslab[®] anti-GBM kit

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

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

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

After a further washing step, detection of specific antibodies is obtained by incubation with substrate solution. The amount of bound antibodies correlates to the colour intensity and is measured in terms of absorbance (optical density (OD)). The absorbance is then calculated against a calibrator curve and the results are given in arbitrary U/ml.

Warnings and precautions

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

- Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Euro Diagnostica.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Warning

Contains ProClin 300:

Reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	May cause an allergic skin reaction.
P264:	Wash hands thoroughly after handling.
P280:	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P302+352:	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+313:	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

Specimen collection

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

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

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

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

Kit components and storage of reagents

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

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

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

Materials or equipment required but not provided

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

PROCEDURE

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

Preparation of washing solution

In case salt crystals are observed in the vial with concentrated wash solution, place the vial at 37°C water bath until the crystals have dissolved before dilution of wash solution. Dilute 10 ml of the 30x concentrated wash solution in 290 ml distilled water. When stored at 2-8° C, the diluted wash solution is stable until the date of expiration of the kit.

Dilution of serum and incubation

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

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

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

After serum incubation

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

Adding conjugate

Add 100 μ l conjugate to each well. Incubate for 30 minutes.

After conjugate incubation

Wash as before.

Adding substrate solution

Add 100 μ l substrate pNPP to each well, incubate for 60 minutes (\pm 10 minutes).

Read the absorbance at 405 nm on a microplate reader.

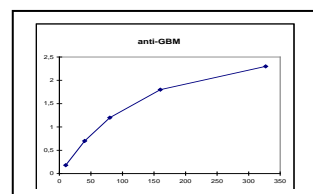
Calculations

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

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

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

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



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

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

Quality Control

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

The OD for calibrator 1 should be > 1,0

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

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

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

Interpretation of results

< 10 U/ml = **Negative**

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

>20 U/ml = **Positive**

Limitations

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

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

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

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

Expected results

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

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

Performance characteristics

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

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

WG = Wegener's granulomatosis, MP = microscopic polyangiitis
 SLE = systemic lupus erythematosus Others = RA, UC, etc.
 GBM = glomerular basement membrane

Clinical sensitivity (Equivocal samples excluded from calculations)

GBM = 38/38 = 100 % 95% CI = 90.7-100 %

Clinical specificity (Equivocal samples excluded from calculations)

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

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

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

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

Wieslab® anti-GBM				
GBM IFA	Positive	Equivocal	Negative	Total
Positive	55	3	0	58
Negative	1	1	8	10
Total	56	4	8	68

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

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

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

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

Wieslab® anti-GBM					
		Positive	Equivocal	Negative	Total
Alternative ELISA	Positive	35	0	0	35
	Equivocal	3	1	0	4
	Negative	0	1	119	120
	Total	38	2	119	159

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Troubleshooting

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

**REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR.
REFERANSER. REFERENSER**

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

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
 96	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

TROUSSE POUR LA DETECTION QUALITATIVE ET LA DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE PAR DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE (ELISA) DES ANTICORPS DIRIGES CONTRE LA CHAÎNE α 3DU COLLAGÈNE TYPE IV (ANTIGÈNE GOODPASTURE) DANS LE SÉRUM HUMAIN

INTRODUCTION

CETTE TROUSSE EST UTILISÉE POUR LE DIAGNOSTIC *IN VITRO*

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

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

Résumé et commentaires

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

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

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

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

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

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

Description de la méthode

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

Prelevement des échantillons

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

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

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

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

Précautions d'emploi

Réactifs contenant des substances d'origine humaine

Produit potentiellement infectieux.

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

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

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

Précautions supplémentaires

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

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

On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le coffret sur demande auprès d'Euro Diagnostica.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Attention

Contient ProClin 300:

Masse de réaction de: 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Peut provoquer une allergie cutanée.
P264:	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P280:	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302+352:	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
P333+313:	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.

Matériel nécessaire mais non fourni

Micropipettes de précision avec embouts jetables.

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

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

Lecteur de plaque avec filtre à 405 nm.

Reactifs

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conservation et stabilité des réactifs

• Tous les réactifs de la trousse sont prêts à l'emploi à l'exception du tampon de lavage et doivent être conservés à 2-8° C.

• Retirer uniquement le nombre de barrettes nécessaire au dosage et refermer soigneusement le sachet d'aluminium.

Préparation des réactifs

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

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

Solution de lavage. En cas d'observation de cristaux de sel dans le flacon contenant la solution de lavage concentrée, placer le flacon dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution complète des cristaux avant de procéder à la dilution de la solution de lavage. Diluer 30 ml de solution de lavage concentrée (X30) dans 870 ml d'eau distillée. Conservée à 2-8° C, la solution de lavage diluée est stable jusqu'à la date de péremption de la trousse.

Des résultats valides et reproductibles sont obtenus uniquement en suivant strictement la notice d'emploi et en utilisant les réactifs spécifiques de la trousse.

PROCEDURE DE DOSAGE

- Couper le sachet d'aluminium et extraire le nombre de barrettes nécessaire (voir « Préparation des réactifs »).

- Diluer le sérum de patient au 1/80 avec le tampon diluant (395 µl de diluant + 5 µl de sérum).

- Distribuer (en doublets) 100 µl de tampon diluant (blanc), de chaque étalon, de contrôle négatif, de contrôle positif et d'échantillon de patient (P), dilué au 1/80 avec le tampon diluant, dans les puits respectifs, selon le tableau de distribution ci-après.

Tableau de distribution des réactifs

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

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

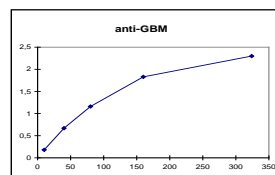
	Blanc	Contrôle négatif	Contrôle positif	Echantillon dilué au 1/80
Diluant pour échantillons	100 µl	-	-	-
Contrôle négatif	-	100 µl	-	-
Contrôle positif	-	-	100 µl	-
Echantillon	-	-	-	100 µl
Incuber pendant 30 min à T.A., laver 3 fois avec la solution de lavage				
Conjugué	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl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

Calcul des résultats**Validation**

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

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

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



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

Contrôle de qualité

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

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

La valeur du contrôle positif voir le lot certificat.

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

Interprétation des résultats

Résultat	Interprétation
≤ 10 U/ml	Négatif
10-20 U/ml	Douteux*
> 20 U/ml	Positif

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

Limites du dosage

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

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

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

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

Résultats attendus

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

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

Performances du dosage

Spécificité et sensibilité diagnostiques

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

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

* Autres = polyarthrite rhumatoïde, colite ulcéreuse, maladie coeliaque, syndrome de Crohn.

** GBM = glomerular basement membrane = membrane basale glomérulaire

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

GBM = 38/38 = 100 %

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

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

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

Spécificité et sensibilité relatives de la trousse Wieslab® anti-GBM comparée au test GBM IFA.

Un total de 68 échantillons congelés a été dosé avec la trousse anti-GBM. Le tableau suivant résume les résultats :

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

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

Sensibilité relative = 55/55 = 100 % **Spécificité relative** = 8/9 = 88,9 %

Justesse relative = 63/64 = 98,4 %

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

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

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

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

Sensibilité relative = 35/35 = 100 % **Spécificité relative** = 119/120 = 99,2 %

Justesse relative = 154/155 = 99,4 %

Précision intra-essai

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

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

Précision inter-essais

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

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

Précision inter-lots

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

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

Linéarité

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

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

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

CAUSES D'ERREUR

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

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

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

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

INSTRUCCIONES DE USO EN VERSIÓN BREVE AL ESPAÑOL

Utilización de los productos

Wieslab® Anti-GBM Set de pruebas es una prueba inmunológica de acoplamiento de enzimas (ELISA) para la identificación y análisis cuantitativo de anticuerpos IgG, los cuales están dirigidos en contra de los glomérulos de las membranas basales en el suero humano. El resultado puede ser un sospechoso indicio del síndrome de Goodpasture. El análisis debe ser realizado por personal calificado..

PARA USO DEL DIAGNOSTICO EN VITRO:

Toma de muestras

El análisis Anti-GBM está concebido para las pruebas de suero. Por favor considere que los diferentes reactivos y sobre todo los sueros pueden tener componentes potencialmente infecciosos. No analice pruebas que sean ictericas, lípidos o hemolíticas. El suero no activado por calor puede mostrar actividad no específica y por tanto no debe ser analizado. Las pruebas pueden ser conservadas entre 2-8° C cuando los análisis se realicen en los próximos días. La conservación a largo plazo debe realizarse a -20° C o más. Los congeladores con autodescongelación no son apropiados para estos casos debido al riesgo de descongelación de las pruebas. Las pruebas que no han sido debidamente almacenadas pueden arrojar resultados erróneos.

NCCLS tiene las normativas para el almacenamiento de muestras de sangre (Approved Standard- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Sólo para uso en diagnóstico in vitro

El suero para la preparación de controles y la calibración fue probado negativamente en antígenos de superficie contra anticuerpos de la debilidad inmunológica humana Virus 1 & 2 (HIV 1&2), Hepatitis C (HCV), Hepatitis B. Es de considerarse en todo caso que ningún método puede garantizar la ausencia de HIV, HCV, Hepatitis B-Virus, u otros componentes infecciosos.

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

El Centers for Disease Control and Prevention (CDC) y el National Institutes of Health (NIH) en Estados Unidos recomiendan que materiales potencialmente infecciosos deben ser investigados en Laboratorios de Nivel de seguridad 2.

Todas las soluciones contienen ProClin 300 como conservante. No manipule nunca la pipeta con la boca. Evite el contacto directo de la piel con los reactivos o las muestras de los pacientes. Reactivos con ProClin 300 actúan de forma irritante. Por eso es indispensable evitar el contacto con la piel y los ojos. En caso de que un reactivo entre en contacto con la piel o los ojos enjuague inmediatamente y con cuidado la zona afectada con gran cantidad de agua.

Pueden solicitarse a Euro Diagnostica las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.



Atención

BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Contiene ProClin 300:

Masa de reacción de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P264:	Lávese bien las manos después de manipular.
P280:	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P302+352:	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
P333+313:	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

Equipo adicional requerido que no es parte integrante del set:

- Espectro fotómetro con filtro para 405 nm.
- Pipeta de precisión con U/ml desechable.
- Instalación de lavado para placas de microtiter, papel secante, tubos de ensayo y cronómetro.

Contenido y conservación

- Un cuadro con tiras de muestras (12x8 well), que están recubiertas con antígenos con sus respectivas tapas. Todo dentro de una bolsa a prueba de aire, relleno de sustancia secante.
 - 1,5 mL control negativo (NC), Suero humano prediluido
 - 1,5 mL control positivo (PC), Suero humano prediluido
 - 13 mL Solución Konjugat con fosfato alcalino unido al anticuerpo Anti-IgG en PBS
 - 2 x 32 mL Diluyente "Diluent" (Dil) , contiene PBS (color rojo).
 - 13 mL solución sustrato pNPP.
 - 30 mL solución de lavado (30x conc)
 - cinco soluciones para calibrar con suero humano diluido 1,5 ml Cal 1 : 320 U/ml, 1,5 ml Cal 2 : 160 U/ml, 1,5 ml Cal 3 : 80 U/ml, 1,5 ml Cal 4 : 40 U/ml, 1,5 ml Cal 5 : 10 U/ml.
- Todos los componentes anteriormente nombrados, excepto el set de solución de lavado están preparados para uso inmediato. Conserve el set en el refrigerador a temperatura (+2-8°C). Por favor manténgase tapado para evitar la evaporación. Extraiga solamente las tiras de muestras que necesite. Las restantes conservarlas en una bolsa cerrada.

PROCEDIMIENTO

Todas las soluciones deben estar a temperatura ambiente. Todas las encubaciones deben realizarse a temperatura ambiente (20-25° C) Mantenerse tapado para evitar la evaporación. Para la incubación rigen los tiempos siguientes: Incubaciones de prueba 30 minutos, incubaciones con solución conjugado 30 minutos, Incubación con Sustratos 60 minutos (± 10 Minutos).

Preparación de la solución de lavado

Si observa cristales de sal en el frasco con solución de lavado concentrada, coloque el frasco en un baño de agua a 37 °C hasta que los cristales se hayan disuelto, antes de la dilución de la solución de lavado. Diluya 10 ml de la solución de lavado concentrado 30X en 290 ml de agua destilada. La solución de lavado es utilizable hasta la fecha de vencimiento si se conserva entre 2-8° C.

Dilución de Prueba y tiempo de Incubación

Diluya la prueba del paciente con 1/80 de diluyente (395µl diluyente +5 µl Suero). Extraiga con la pipeta 100µl () Diluyente (Sin valor), Solución de calibración 1,2,3,4,5, NC,PC y la muestra de paciente. Como en el diagrama. Incúbase tapado durante 30 minutos

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

Después de la Incubación/ Adición de solución conjugat

Lávese tres veces 300µl con solución de lavado. Con cada ciclo de lavado sea muy cuidadoso al vaciar y rellenar las probetas. Después del último lavado debe extraerse el líquido restante mediante la absorción del papel (tiras de muestra).

A

□nada 100 ul de solución

Después de la incubación

Lávese como se indicó anteriormente .

Anadir solución substrato

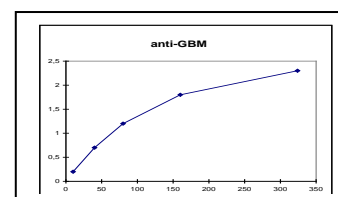
Añádas 100µl de substrato en solución a cada reactivo. Durante 60 Minutos en (+/- 10 Minutos) de incubación.

Mida la absorción con un espectómetro de 405nm

Calculación

Saque los valores de las restantes pruebas. Dibuje una curva de calibración, en donde se marquen los valores OD contra las U/ml de la solución de calibración. A las 5 Soluciones de calibración se le han ordenado los valores arbitrariamente Solución de calibración 1 comprende 320 U/ml, Solución de calibración 2 : 160 U/ml, Solución de calibración 3 : 80 U/ml, Solución de calibración 4: 40 U/ml, Solución de calibración 5 : 10 U/ml. Tome de la curva de valoración los resultados de la muestra de los pacientes. Valores mayores de 320 tienen que ser indicados > 320 , alternativamente debe repetirse el análisis con una prueba más diluída.El resultado del Test de Wieslab® lo indica en U/ml arbitrarias, debido a que para la indicación del concentrado Anti-GBM-Titern no hay un reconocimiento tipo (Standard internacional.

Ejemplo:	Solución de calibración	U/ml	Absorción
	1	320	2,3
	2	160	1,8
	3	80	1,2
	4	40	0,7
	5	10	0,18



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

Control de calidad

La absorción del control negativo debe ser inferior a 5.

El valor de la solución de calibración tiene que ser >1,0.

El valor para el control positivo y negativo se extrae del Certificado-Lot. El valor para el control positivo y negativo se utilizan para verificar si el Set ha funcionado técnicamente. El control positivo no garantiza seguridad de medición fuera de las U/ml de medición aquí expuestas. Recomendamos en estos casos efectuar un control adicional. Si uno o más valores están fuera de la escala de valoración indicada, el test no tendría validez y el análisis debe repetirse. En caso de que las autoridades locales lo exijan pueden continuarse analizando los controles. Recomendaciones respecto a la calidad y control pueden ser tomadas del NCCLSs Dokument C24-A.

Análisis de los Resultados

< 10 U/ml = **negativo**

10-20 U/ml = **Dudoso/no determinante**. Repeta la prueba. En caso de que se repita un resultado dudoso opte por un procedimiento alternativo , o analice una nueva muestra.

>20 U/ml = **positivo**

Limitaciones del Análisis

El concentrado de anticuerpos de un solo paciente no puede ser utilizado para dictaminar la gravedad de la enfermedad, debido a que los anticuerpos de diferentes pacientes presentan diferentes afinidades (del antígeno aquí utilizado). Es por eso que el análisis es difícil de tipificar.

La utilización de los resultados de este análisis no son suficientes para un dictamen clínico. En lugar de eso deben considerarse los análisis del Test conjuntamente con otros parámetros relevantes como por ejemplo parámetro clínico (síntomas, etc) para una valoración correcta y específica de la situación clínica. Es conocido que sueros de pacientes con otras enfermedades autoinmunes y generalmente individuos sanos muestran reacción cruzada () en los resultados de los análisis sin que se tenga prueba de indicios de enfermedad. En otras palabras, un individuo puede reaccionar positivamente para Anti-GBM, sin que haya pruebas clínicas para señalar una enfermedad. Al mismo tiempo se sabe que pacientes que padecen la enfermedad pueden reaccionar en forma negativa con anticuerpos Anti-GBM. Un tratamiento de inmunosupresión no debe comenzarse motivado por un resultado positivo Anti-GBM. Un tratamiento tampoco debe iniciarse o modificarse por cambios en la concentración de Anti-GBM sino que en todo caso debe basarse en el cuadro clínico general. La concentración Anti-GBM de un suero específico puede variar después del análisis con diferentes métodos de pruebas. Esto se debe a las diferentes características y sensibilidad de los reactivos que provienen de diferentes Sets y diferentes fabricantes.

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

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

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
 96	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

GEBRAUCHSANWEISUNG IN DEUTSCHER KURZFASSUNG

Benutzung des Produktes

Wieslab® Anti-GBM Test Set ist ein enzymgekoppelter Immunnachweis (ELISA) für die Bestimmung und Quantifizierung von IgG Antikörper, **welche** gegen die glomerulären Basalmembranen in Humanserum gerichtet **sind**. Das Resultat kann als Hinweis bei Verdacht von Goodpasture Syndrom dienen. Die Analyse soll von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

NUZUNG IN DER IN VITRO DIAGNOSTIK:

Probenentnahme

Die Anti-GBM-Analyse ist für Serumproben gedacht. Bitte bedenken Sie, dass verschiedene Reagenzien und vor allem die Serumproben potentiell infektiöse Bestandteile beinhalten könnten. Analysieren Sie keine Proben, die ikterisch, lipämisch oder hämolysiert sind. Wärmeinaktiviertes Serum kann unspezifische Aktivität zeigen und sollte deswegen nicht analysiert werden. Proben können bei 2-8° C aufbewahrt werden, wenn die Analyse innerhalb der nächsten Tage gemacht wird. Eine langfristige Aufbewahrung sollte bei -20°C oder kälter erfolgen. Gefrierschränke mit automatischer Abtaueinrichtung sind nicht für die Aufbewahrung geeignet, da das Risiko des Auftauens der Proben besteht. Proben, die nicht ordnungsgemäß gelagert worden sind, können falsche Ergebnisse hervorrufen.

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

Sicherheitsinformation

Nur für die in-vitro-Diagnostik zu benutzen

Das Serum für die Präparierung von Kontrollen und Kalibrierung wurde auf Antikörper gegen die menschliche Immunschwäche-Viren 1 & 2 (HIV 1&2), Hepatitis C (HCV), Hepatitis B Oberflächenantigen getestet mit einem negativen Ergebnis. Es ist jedoch in jedem Fall zu bedenken, dass keine Methode die Abwesenheit von HIV, HCV, Hepatitis B-Virus, oder andere infektiöse Bestandteile zur Gänze garantieren kann.

Alle humanen Proben müssen deswegen als potentiell infektiös betrachtet und mit Sorgfalt behandelt werden.

Das Centers for Disease Control and Prevention (CDC) und das National Institutes of Health (NIH) in den USA empfehlen, dass potentiell infektiöse Materialien in Labors mit der Sicherheitsstufe 2 untersucht werden sollten.

Alle Lösungen beinhalten ProClin 300 als Konservierungsstoff. Pipetieren Sie niemals mit dem Mund. Vermeiden Sie direkten Kontakt bei Umgang mit Reagenz- oder Patientenproben mit der Haut.

Reagenzien mit ProClin 300 wirken reizend. Deswegen sind der Kontakt mit Haut und Augen unbedingt zu vermeiden. Für den Fall dass Reagenzien mit Haut oder Augen in Berührung gekommen sind, spülen Sie sofort die betroffenen Stellen mit viel Wasser sorgfältig ab.

Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile auf Anfrage von Euro Diagnostica erhältlich.



Achtung

BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Enthält ProClin 300:

Reaktionsmasse aus: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
P264:	Gründlich die Hände waschen nach Gebrauch.
P280:	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
P302+352:	BEI HAUT KONTAKT: Mit sehr viel Seife und Wasser waschen.
P333+313:	Im Falle einer Hautreizung oder -ausschlags: Ärztlichen Rat einholen, bzw. zur Kenntnis bringen.

Zusätzlich erforderliche Ausrüstung, die nicht Bestandteile des Sets sind:

- Spektrophotometer mit Filter für 405nm.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen
- Waschvorrichtung für Microtiterplatten, Papier zum Abtrocknen, Reagenzgläser, Zeitschaltuhr

Verpackungsinhalt des Sets und dessen Aufbewahrung

- Ein Rahmen mit Probestreifen (12x8 well), die mit GBM Antigen beschichtet sind mit nebst zugehörigem Deckel. Aufbewahrt in einem mit Trockenmittel gefülltem wiederverschließbaren Beutel aus luftdichter Folie .
- 1,5 ml Negative Kontrolle (NC), vorverdünntes Humanserum in „Diluent“
- 1,5 ml Positive Kontrolle (PC), vorverdünntes Humanserum, in „Diluent“
- 13 ml Konjugatlösung mit alkalischer Phosphatase gekoppelt an Anti-IgG Antikörper in PBS und verdünntem Proteinstabilisator (blaue Farbe)
- 2 x 32 ml Verdünnungspuffer "Diluent" (Dil) , enthält PBS (rote Farbe).
- 13 ml Substrat pNPP Lösung
- 30 ml Waschlösung (30x Konzentriert)
- fünf Kalibrationslösungen mit verdünntem Humanserum. 1,5 ml Cal 1 : 320 E/ml, 1,5 ml Cal 2 : 160 E/ml, 1,5 ml Cal 3 : 80 E/ml, 1,5 ml Cal 4 : 40 E/ml, 1,5 ml Cal 5 : 10 E/ml

Alle zuvor genannten Bestandteile, außer der Waschlösung im Kit, sind gebrauchsfertig. Bewahren Sie das Set im Kühlschrank bei +2-8° C auf. Bitte benutzen Sie einen Deckel um Verdunstung zu verhindern. Bitte entnehmen Sie nur so viele Probestreifen wie nötig. Die restlichen Probestreifen müssen in dem geschlossenen Beutel aufbewahrt werden.

TESTPROZEDUR

Alle Lösungen vor Gebrauch auf Zimmertemperatur erwärmen lassen. Alle Inkubationen bei Zimmertemperatur (20-25° C) durchführen. Um Verdunstung zu verhindern, muss ein Deckel benutzt werden. Für die Inkubation gelten folgende Zeiten: Probeinkubationen 30 Minuten, Inkubationen mit Konjugatlösung 30 Minuten, Substartinkubation 60 Minuten (± 10 Minuten)

Zubereitung der Waschlösung

Falls sich in dem Röhrchen mit der konzentrierten Waschlösung Salzkristalle gebildet haben, dieses vor Verdünnung der Waschlösung in ein 37°C warmes Wasserbad stellen, bis sich die Salzkristalle aufgelöst haben. Verdünnen Sie 10 ml der 30-fach konzentrierte Waschlösung mit 290 ml destilliertem Wasser. Die verdünnte Waschlösung ist bei Aufbewahrung bei 2-8° C bis zum Verfallsdatum des Sets haltbar.

Probeverdünnung und Inkubationszeiten

Verdünnen Sie die Patientenprobe mit 1/80 mit dem Probenverdünnungspuffer (395µl Diluent +5 µl Serum).

Pipettieren Sie 100µl Verdünnungspuffer (Leerwert), Kalibrationslösung 1,2,3,4,5, NC,PC und Patientenprobe (P) wie in u.a. Schemata. Inkubieren Sie 30 Minuten mit Deckel.

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

Nach der Probeninkubation / Zusatz von Konjugatlösung

Waschen Sie 3 Mal mit 300µl Waschlösung /Ansatz. Bitte sehr sorgfältig die Probengefäße bei jedem Waschschrift befüllen und leeren. Nach dem letzten Wascheschritt die verbleibenden Flüssigkeiten durch Abklopfen der Probestreifen auf absorbierendem Papier entfernt.

Fügen Sie 100 µl Konjugatlösung zu jedem Reaktionsansatz hinzu. Inkubieren Sie für 30 Minuten.

Nach der Konjugatinkubation

Waschen Sie wie oben angegeben

Hinzufügen der Substrat pNPP lösung

Fügen Sie 100µl Substratlösung zu jedem Reaktionsansatz hinzu. Für 60 Minuten (+/- 10 Minuten) inkubieren.

Messen Sie die Absorption mit einem Spektrophometer bei 405nm.

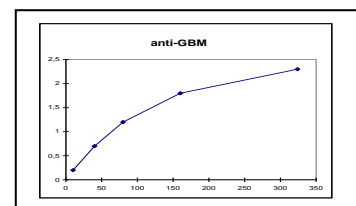
Auswertung

Ziehen Sie den Leerwert von den übrigen Proben ab. Zeichnen Sie eine Kalibrationskurve, indem Sie die OD-Werte gegen die E/ml in den Kalibrierlösungen auftragen. Den 5 Kalibrierlösungen sind folgende Werte willkürlich zugeordnet worden: Kalibrierlösung 1: entspricht 320 E/ml, Kalibrierlösung 2 : 160 E/ml, Kalibrierlösung 3 : 80 E/ml, Kalibrierlösung 4: 40 E/ml, Kalibrierlösung 5 : 10 E/ml.

Entnehmen Sie die Werte der Patientenprobe aus der Kurve. Werte größer als 320 sollen als > 320 angegeben werden, alternativ wird die Analyse mit einer stärker verdünnten Probe wiederholt.

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

Beispiel:	Kalibrierlösung	E/ml	Absorbtion
	1	320	2,3
	2	160	1,8
	3	80	1,2
	4	40	0,7
	5	10	0,18



Wichtig: Die gezeigte Kurve ist nur ein Beispiel und darf nicht für die Ablesung von Patientenproben benutzt werden.

Qualitätskontrolle

Die Absorption der Negativkontrolle soll weniger als 5 betragen.

Der Messwert für Kalibrierlösung 1 soll >1,0 sein.

Der Wert für die Positiv- und die Negativkontrolle, wird aus dem Lot-Zertifikat entnommen. Positiv- und Negativkontrolle werden benutzt, um festzustellen, ob das Set technisch funktioniert hat. Die Positivkontrolle garantiert keine Messsicherheit außerhalb des hier angegebenen Messbereiches. Es wird geraten, in diesem Bereich eine zusätzliche Kontrolle durchzuführen. Falls eine oder mehrere Werte nicht innerhalb der angegebenen Größenordnung liegen, sollte der Test als nicht gültig erklärt und die Analyse wiederholt werden. Sollte es erforderlich sein, können weitere Kontrollen analysiert werden. Empfehlungen betreffend Qualitätskontrolle können aus dem NCCLSs Dokument C24-A entnommen werden.

Auswertung der Resultate

< 10 E/ml = **negativ**

10-20 E/ml = **Nicht eindeutig**, Test wiederholen, wenn der Wiederholungstest ebenfalls nicht eindeutig ist, bitte ein alternatives Nachweisverfahren verwenden, oder eine neue Probe anfordern.

>20 E/ml = **positiv**

Die Grenze der Analyse

Der Antikörpertiter eines einzelnen Patienten kann für die Beurteilung von dem Schweregrad der Krankheit nicht benutzt werden, da die Antikörper von unterschiedlichen Patienten unterschiedliche Affinitäten (zum hier verwendeten Antigen) aufweisen können. Die Analyse ist deshalb schwer zu standardisieren. Die ausschließliche Verwendung der Ergebnisse der Analyse dieses Testes sind für eine klinische Beurteilung nicht ausreichend. Stattdessen müssen die Ergebnisse der Analyse zusammen mit anderen relevanten Parametern benutzt werden, wie z.B. klinische Parameter (Symptome etc.), um eine korrekte Beurteilung der spezifischen klinischen Situation erfassen zu können. Es ist bekannt, dass Sera von Patienten mit anderen autoimmunen Krankheiten und generell gesunden Individuen eine gewisse Kreuzreaktion () in der Analyse aufweisen können. Mit anderen Worten, einige Individuen können also positiv für Anti-GBM Antikörper reagieren, ohne dass sonstige klinische Belege für die Krankheit angezeigt werden. Gleichzeitig ist es auch bekannt, dass Patienten mit aktiver Krankheit negativ Anti-GBM-Antikörper reagieren können. Mit der Behandlung von Immunsuppressiva darf nicht nur auf Grund eines positiven Anti-GBM Resultates begonnen werden. Eine Behandlung darf auch nicht aufgrund von Veränderungen der Anti-GBM Titer initiiert oder geändert werden, sondern muss in jedem Fall auf das klinische Gesamtbild basieren. Die Anti-GBM Konzentrationen in einem spezifischen Serum kann nach Analyse mit unterschiedlichen Testmethoden variieren. Das beruht primär auf unterschiedliche Eigenschaften und Empfindlichkeiten der Reagenzien, die aus unterschiedlichen Sets verschiedener Hersteller stammen.

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

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

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
 96	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

ISTRUZIONI D'USO ABBREVIATE

Uso previsto

Wieslab® anti GBM è un kit immunoenzimatico, (ELISA) per la determinazione e la quantificazione degli anticorpi IgG e glomerulari della membrana basale nel siero umano. Il test si usa per la rivelazione degli anticorpi in un singolo campione di siero. I risultati della prova possono essere usati come un aiuto per la diagnosi della sindrome di Goodpasture. Le analisi dovranno essere eseguite da laboratori professionali specializzati.

USO PER LE DIAGNOSTICHE IN VITRO.

Raccolta dei campioni

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

Evitare di usare campioni che sono itterici, lipenici o emolizzati.

Si sconsiglia l'esecuzione del test su sieri inattivati tramite calore in quanto possono produrre reattività non specifiche. Conservare il siero tra 2-8° C se il test sarà eseguito entro cinque giorni. Se i campioni saranno conservati per periodi più lunghi, dovranno essere conservati ad una temperatura di -20° C o più bassa, congelatori con sbrinatori automatici non sono adatti in quanto esiste il rischio che i campioni durante lo sbrinamento si scongelino e questo degraderebbe gli anticorpi. I campioni che sono posizionati in modo errato o che sono soggetti a sbrinamenti possono produrre risultati errati. La NCCLS ha stabilito le norme per il corretto posizionamento dei campioni di sangue (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Avvertenze e precauzioni

- Da usare solo per diagnostiche in vitro.
- I componenti del siero umano usati per la preparazione del controllo e la calibratura nel kit sono stati testati e risultati negativi alla presenza di anticorpi nel sistema immunitario dei virus 1 & 2 (HIV 1&2), epatite C (HCV), epatite B, antigeni superficiali dal metodo approvato FDA. È però da considerare che nessun metodo può offrire complete garanzie che agenti dei virus HIV, HCV, Epatite B virus, o altri agenti infettivi siano assenti, tutti i vari campioni e prove devono quindi essere trattati come potenziali vettori di malattie infettive.
- Il Centro per le Malattie Controllo e Prevenzione e l'Istituto Nazionale per la Salute degli Usa raccomandano che il materiale potenzialmente infettivo sia maneggiato da bio-laboratori a livello di sicurezza 2.
- Tutte le soluzioni contengono ProClin 300 come conservante. Non pipettare mai con la bocca evitare che i reagenti entrino in contatto con gli occhi o la pelle. I reagenti contenenti ProClin possono essere irritanti. In caso di contatto lavare subito con acqua abbondante.
- La concentrazione di anti GBM in un dato campione può variare nei valori a seconda dei vari produttori a causa delle diversità dei metodi e delle specificità dei reagenti.
- Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Euro Diagnostica.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Attenzione

Contiene ProClin 300:

Miscela di: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Può provocare una reazione allergica cutanea.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P302+352:	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
P333+313:	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

Materiali o accessori necessari ma non inclusi nel kit

- lettore di micropiastre con filtro 405 nm.
- pipette di precisione con puntali monouso.
- attrezzatura per il lavaggio dei pozzetti, carta assorbente, provette e timer.

Componenti del Kit e conservazione dei reagenti

- una cornice con strips (12x8) rivestiti di antigeni GBM. il tutto sigillato in una busta di alluminio con essiccante.
 - 1.5 ml di controllo negativo (NC) contenente siero umano e diluente.
 - 1.5 ml di controllo positivo (PC) contenente siero umano e diluente.
 - 13 ml cognugati con fosfati alcalini diretti contro anticorpi umani IgG , tampone PBS
 - 2 x 32 ml Diluente (Dil) contenente PBS (colore rosso).
 - 13 ml substrato pNPP
 - 30 ml soluzione di lavaggio concentrata 30x .
 - cinque calibratori contenenti siero umano in diluente. 1.2 ml Cal 1 = 320 U/ml, 1.2 ml Cal 2 = 160 U/ml, 1.2 ml Cal 3 = 80 U/ml, 1.2 ml Cal 4 = 40 U/ml, 1.5 ml Cal 5 = 10 U/ml.
- Tutti I reagenti del Kit sono già pronti per l'uso escluso la soluzione di lavaggio che deve essere conservata a +2-8° C. Utilizzare solo le strips necessarie al test. Rimettere le strips rimanenti nel sacchetto protettivo con l'essiccante.

PROCEDURA

Tutte le soluzioni devono essere usate a temperatura ambiente. Incubate sempre a temperatura ambiente (20-25° C) con coperchio. Incubate il siero per 30 minuti, il cognugato per 30 minuti e il substrato per 60 minuti (\pm 10 minuti).

Preparazione della soluzione di lavaggio

Se nella fiala della soluzione di lavaggio concentrata si osserva la formazione di cristalli di sale, scaldare la fiala a bagnomaria a una temperatura di 37°C fino allo scioglimento di tutti i cristalli prima della diluizione della soluzione di lavaggio. Diluite 10 ml della soluzione di lavaggio concentrata 30x in 290 ml di acqua distillata. Se conservata a + 2-8° C, la soluzione di lavaggio diluita è stabile fino alla data di scadenza del Kit.

Diluzione del siero e incubazione.

Diluite il siero del paziente 1/80 con diluente (395 μ l diluente +5 μ l siero). Pipettate 100 μ l/pozzetto in doppio diluente , Calibratori 1, 2, 3, 4, 5, NC, PC e diluite il siero del paziente(P) come dal seguente diagramma . incubate per 30 minuti con coperchio

	1	2	3	4	5
A	Dil	Cal 4	P1		
B	Dil	Cal 4	P1		
C	Cal 1	Cal 5	P2		
D	Cal 1	Cal 5	P2		
E	Cal 2	NC	etc		
F	Cal 2	NC			
G	Cal 3	PC			
H	Cal 3	PC			

Dopo l'incubazione dei campioni/ aggiungere il coniugato

Lavare ogni pozzetto 3 volte con 300 µl della soluzione di lavaggio riempire e svuotare i pozzetti ogni volta, dopo l'ultimo lavaggio svuotare tutti i pozzetti e asportare i residui liquidi con carta assorbente.

Aggiungere 100 µl di coniugato in ogni pozzetto. Incubate per 30 minuti

Dopo l'incubazione del coniugato

Lavare come sopra descritto

Aggiunta della soluzione del substrato pNPP

Aggiungi 100 µl della soluzione del substrato in ogni pozzetto, incubate per 60 minuti (\pm 10 minuti). Leggere le assorbenze a 405 nm con un lettore di micropiastre.

Calcolo dei risultati

Analisi quantitativa:

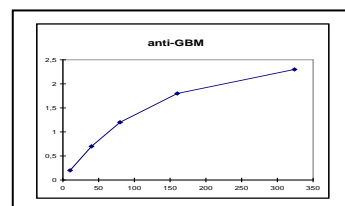
Sottrarre il valore di densità ottica del bianco campione dagli altri valori di densità.

Disegna diagramma del OD per ogni U/ml a' di valore dei 5 calibratori.

Ai 5 calibratori assegnati in dotazione nel Kit sono stati assegnati valori arbitrari. 320 U/ml a' per il calibratore nr.1, 160 U/ml a' per il calibratore nr.2, 80 U/ml a' per il calibratore nr.3, 40 U/ml a' per il calibratore nr.4, e 10 U/ml a' per il calibratore nr.5. Leggete le U/ml a' di valore del paziente dal diagramma. I valori piu' grandi di 320 dovranno essere cosi riportati >320, o ripetete il test con una diluizione piu' alta.

Le U/ml a' arbitrarie sono state adottate da Wieslab®, questo modello non e' riconosciuto a livello internazionale, ma esiste espressamente per i valori anti - GBM.

<u>Esempi:</u>	<u>Calibratori</u>	<u>U/mla</u>	<u>Assorbimento</u>
	1	320	2.3
	2	160	1.8
	3	80	1.2
	4	40	0.7
	5	10	0.18



Importante: il diagramma e' solo un esempio e non deve essere tenuto in considerazione per l'interpretazione delle analisi dell'attuale paziente.

Controllo di qualita

La densita' ottica del controllo negativo dovra essere inferiore a quella del calibratore 5.

La densita' ottica del calibratore 1 dovra essere > 1,0

Per il valore del controllo positivo vedere certificato annesso. I controlli positivo e negativo si utilizzano per monitorare l'eventuale malfunzionamento dei reagenti. Il controllo positivo non assicura la precisione dei valori vicini al cut-off. In questo caso raccomandiamo di fare un test addizionale.

Se uno dei valori non rientra nel suo raggio rispettivo, il test non deve considerarsi valido e quindi dovra' essere ripetuto. Con controlli addizionali possono essere fatti, secondo le direttive guida o disposizioni delle locali regole statali o federali o organizzazioni accreditate. Riferimento al NCCLS C 24-A per la guida alle pratiche appropriate del controllo qualita'

Interpretazione dei risultati

< 10 U/mla = **Negativo**

> 20 U/mla = **Positivo**

11-20 U/mla = **Equivoco**; Ritesta, se risulta ancora equivoco ritesta con un metodo alternativo o testa un altro campione.

Limitazioni

Il valore degli anticorpi di ogni singolo paziente non può essere utilizzato per misurare la gravità della malattia, in quanto gli anticorpi dei diversi pazienti possono differire l'un l'altro per affinità, pertanto è difficile ottenere una standardizzazione assoluta dei risultati.

Il test non deve essere utilizzato come unico mezzo per decisioni su terapie cliniche, ma deve essere utilizzato in combinazione con i parametri clinici e i risultati di altri test disponibili. Sieri di pazienti con malattie autoimmuni e di individui sani possono contenere potenziali autoanticorpi cross-reattivi. Alcuni individui possono risultare positivi agli anticorpi anti GBM anche con leggere o nessun segno di sintomo della malattia. D'altra parte, alcuni pazienti con patologie attive, possono avere livelli anticorpali non rilevabili. Quindi la terapia non deve iniziare sulla base di un risultato anti GBM positivo. L'inizio o il cambiamento di un trattamento non devono basarsi solo su variazioni della concentrazione del I anti GBM, ma piuttosto sulla base di osservazioni cliniche accurate.

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

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

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Udløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

EM RESUMO INSTRUÇÃO DE PORTUGUISE

UTILIZAÇÃO PREVISTA

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

Advertências e precauções

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



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Atenção

Contém ProClin 300:

A reacção de massa: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
P264:	Lavar as mãos cuidadosamente após manuseamento.
P280:	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P302+352:	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes.
P333+313:	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.

Colheita de amostras

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

Evitar a utilização de soros ictericos, lipemicos e hemolisados.

Soros inactivados pelo calor podem produzir reactividades inespecificas e não devem ser utilizados.

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

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

Componentes do kit e conservação de reagentes

- Uma placa com tiras (12 x 8) revestidas com antigénio da MBG (cadeia alfa 3) com uma tampa, acondicionada numa embalagem selada de folha de alumínio com exsiccante.

- 1,5 ml de controlo negativo (NC) contendo soro humano em diluente.

- 1,5 ml de controlo positivo (PC) contendo soro humano em diluente.

- 13 ml de conjugado contendo anticorpos anti-IgG humana marcados com fosfatase alcalina (cor azul).

- 2 x 32 ml de diluente (Dil) contendo PBS (cor vermelha).

- 13 ml de substrato pNPP.

- 30 ml de solução de lavagem concentrada 30x

- Cinco calibradores contendo soro humano em diluente. 1,5 ml de Cal 1 = 320 U/ml, 1,5 ml de Cal 2 = 160 U/ml, 1,5 ml de Cal 3 = 80 U/ml, 1,5 ml de Cal 4 = 40 U/ml, 1,5 ml de Cal 5 = 10 U/ml.

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

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

Materiais ou equipamento necessários mas não fornecidos

- Leitor de microplacas com filtro de 405 nm.

- Pipetas de precisão com pontas descartáveis.

- Máquina de lavar as tiras, papel absorvente, tubos e um temporizador.

PROCEDIMENTO

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

Preparação da solução de lavagem

Caso sejam observados cristais de sal no frasco com solução de lavagem concentrada, coloque o frasco num banho de água a 37°C, até os cristais se dissolverem, antes de diluir a solução de lavagem. Diluir 10 ml da solução de lavagem concentrada 30x em 290 ml de água destilada. Quando conservada a 2°C-8°C, a solução de lavagem diluída é estável até ao prazo de validade indicado no kit.

Diluição do soro e incubação

Diluir o soro do doente a 1/80 com diluente (395 µl de diluente + 5 µl de soro).

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

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

Após incubação do soro

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

Adição de conjugado

Adicionar 100 µl de conjugado em cada poço. Incubar durante 30 minutos.

Após incubação do conjugado

Lavar como acima indicado.

Adição da solução de substrato

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

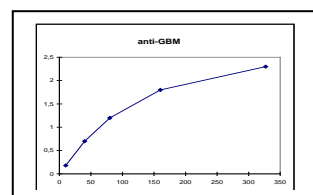
Cálculos

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

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

A Wieslab® adoptou um valor arbitrário em U/ml, dado não existir um padrão internacional comprovado para exprimir os títulos de anti-MBG.

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



Uma amostra com um valor de absorvância de 0,7 é lida no eixo X como tendo 40 U/ml de anti-MBG. **Importante:** A curva é dada apenas a título de exemplo e não deve ser utilizada para interpretação efectiva de resultados de um doente em particular.

Controlo de qualidade

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

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

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

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

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

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

Interpretação dos resultados

< 10 U/ml = **Negativo**

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

> 20 U/ml = **Positivo**

Limitações

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

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

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

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

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

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

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medisinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

KORTFATTET DANSK INSTRUKTION.**Produktets anvendelse**

Wieslab® anti-GBM test kit er et enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) til bestemmelse og kvantificering af IgG antistoffer rettet mod glomerulære basalmembran (GBM) i humant serum. Resultatet kan give vejledning ved udredning af mistanke om Goodpastures syndrom. Analysen skal udføres af uddannede laboranter. Må kun anvendes til *in vitro* teknik.

Prøvetagning.

Anti-GBM analysen anvendes på serumprøver. Vær opmærksom på at flere reagenser og ikke mindst serumpøver kan indeholde infektiøst materiale. Undlad at analysere sera som er ikteriske, lipidholdige eller hæmolyserede. Varme inaktiverede sera kan give uspecifikke reaktioner og bør derfor ikke analyseres. Prøverne kan opbevares ved 2-8°C hvis analysen sker indenfor nogle få dage. Langtidsopbevaring af sera skal ske ved -20°C eller koldere. Anvend ikke fryserne med automatisk afrimning, da man risikere at sera bliver tøet og frosset og dermed nedbryder antistofferne. Prøver som opbevares forkert kan give forkerte resultater. NCCLS har givet anbefalinger om hvordan man opbevarer blodprøver. (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Sikkerhedsinformation

- Kun for *in vitro* diagnostik.
- Serum som anvendes ved præparation af kontroller og kalibratorer er testet negative for human immunodeficiency virus 1 og 2 (HIV 1 og 2), hepatitis C (HCV) og hepatitis B antigen. Bemærk at ingen metode helt kan garantere fravær af HIV, HCV, hepatitis B virus og andre infektiøse agens. Alle humane prøver må derfor betragtes som potentielt infektiøse og håndteres med forsigtighed.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC) og National Institutes of Health (NIH) i USA anbefaler at potentielt infektiøse materialer håndteres i overensstemmelse med Biosafety Level 2.
- Alle opløsninger indeholder ProClin 300 som konserveringsmiddel. Brug aldrig mundpipette. Undgå at få reagens eller serum direkte på huden. Reagenser med ProClin 300 er irriterende og derfor skal kontakt med hun og øjne undgås. Hvis det sker at reagens kommer i kontakt med hud eller øjne, skyl med store mængder vand.
- Materiale-sikkerhedsdatablade for alle farlige komponenter i dette kit fås ved henvendelse til Euro Diagnostica.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Advarsel

Indeholder ProClin 300:
Blanding af: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Kan forårsage allergisk hudreaktion.
P264:	Vask hænderne grundigt efter håndtering.
P280:	Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjnebeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
P302+352:	VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt sæbe og vand.
P333+313:	Ved hudirritation eller udslæt: Søg lægehjælp.

Nødvendig udstyr og materiale som ikke indgår i kittet.

- Spektrofotometer med filter på 405 nm.
- Præcisionspipetter med engangsspids.
- Vaskemaskine til mikrotiterplader, filtrepapir, prøverør, minutur.

KIT komponenter og opbevaring af reagenser.

- En ramme med strips (12 x 8 brønde) belagt med GBM og et låg. Alt er pakket i tætsluttende foliepose med tørringsmiddel.
- 1,5 ml negativ kontrol (NC), humant serum færdig fortyndet i "diluent"
- 1,5 ml positiv kontrol (PC), humant serum færdigfortyndet i "diluent".
- 13 ml konjugatopløsning, alkalisk phofatase-mærket anti-IgG antistoffer fortyndet i PBS med proteinstabilisator (blå farve)
- 2 x 32 ml fortyndingsningsbuffer. "Diluent" (Dil) (rød farve)
- 13 ml substrat pNPP
- 30 ml vaskebuffer, 30 x koncentreret.
- fem kalibratorer med fortyndet humant serum, 1,5 ml Cal 1 = 320 E/ml, 1,5 ml Cal 2 = 160 E/ml, 1,5 ml Cal 3 = 80 E/ml, 1,5 ml Cal 4 = 40 E/ml, 1,5 ml Cal 5 = 10 E/ml.

Alle reagenser i kittet er færdige til brug undtagen vaskebufferen. Opbevar kittet i køleskab ved (2 – 8° C)

Tag kun det antal strips ud som behøves. Resten skal opbevares i aluminiumsposen, som opbevares tillukket.

TESTPROCEDURE

Alle opløsningerne skal have stuetemperatur før de anvendes. Alle inkubationer skal ske ved stuetemperatur (20-25° C). Anvend låg for at undgå fordampning. Følgende inkubationstider gælder: Første inkubation med patientsera 30 minutter, inkubation med konjugat 30 minutter, substratinkubation 60 minutter(±10 minutter).

Tilberedning af vaskebuffer

Hvis der observeres saltkrystal udfælding i flasken med koncentreret vaskeopløsning, skal flasken placeres i et 37°C vandbad indtil krystallerne er opløst. Derefter fortyndes vaskeopløsningen. 10 ml af den 30 x koncentrerede vaskebuffer tilsættes 290 ml destilleret vand. Den færdigfortyndede vaskebuffer holder til kittets udløbsdato, hvis den opbevares ved 2 – 8° C.

Prøvefortynding og inkubationstider

Fortynd patientprøve 1/80 med fortyndingsbuffer (395µl diluent+ 5µl serum) tilsæt 100 µl/brønd i duplikat af følgende: diluent (blank værdi), kalibrator 1, 2, 3, 4, 5, NC, PC og patientprøver (P) efter nedenstående skema. Inkuber i 30 minutter med låg.

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

Efter inkubering /tilsætning af konjugat

Vask 3 gange med 300 µl vaskebuffer / brønd, vær omhyggelig med at tømme og fylde brøndene helt ved hver vaske cyclus .Efter sidste vask skal alle rester af buffer fjernes ved at slå mikrotiter stripsene mod absorberende papir.

Tilsæt 100 µl konjugatopløsning til hver brønd. Inkuber i 30 minutter.

Efter konjugat inkubering

Der vaskes som tidligere.

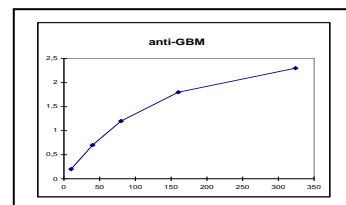
Tilsætning af substrat pNPP

Tilsæt 100 µl substrat pNPP i hver brønd, inkuber i 60 minutter (±10 minutter) Aflæs absorbansen i spektrofotometer ved 405 nm.

Bemærkninger

Træk absorbansen fra alle de øvrige prøvers absorbans. Tegn en kalibreringskurve igennem de fem kalibratorers absorbans værdi mod deres respektive opgivne arbitrære E/ml. De fem kalibratører har følgende arbitrære værdier: Kalibrator 1: 320 E/ml, kalibrator 2: 160 E/ml, kalibrator 3 : 80 E/ml, kalibrator 4: 40 E/ml, kalibrator 5: 10 E/ml. Aflæs patientens enhedsværdi på kurven. Værdier større end 320 skal angives >320, alternativt analyseres prøven om med en større fortynding. Testresultatet angives i arbitrære E/ml af Wieslab®, da ingen erkendt international standard findes til angivelse af anti-GBM titre.

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



Vigtigt: Den viste kurve er kun et eksempel og må ikke anvendes til aflæsning af patientprøver.

Kvalitetskontrol

Den negative kontrols absorbans skal være mindre end kalibrator 5

Absorbans for kalibrator 1 skal være > 1,0

Enhedsværdien for den positive og negative kontrol ses på lot certifikatet.

De negative og positive kontroller anvendes for at kontrollere at kittet fungerer teknisk. Hvis nogle værdier ikke falder inden for de angivne områder bør testen ikke godkendes og man skal lave analysen om. Yderligere kontroller kan analyseres, hvis det kræves af de lokale myndigheder. Anbefalinger vedrørende kvalitetskontrol kan fås hos NCCLSs dokument CA4-A.

Tolkning af resultaterne

< 10 E/ml = **Negativ**

10-20 E/ml = **Gråzon**, Gentag testen, hvis der opnås samme resultat så anvend alternativ metode.

>20 E/ml = **Positiv**

Tolkning af resultaterne

En enkelt patients antistof værdi kan ikke anvendes til at bedømme graden af sygdom idet antistoffer fra forskellige patienter adskiller sig med hensyn til affinitet, specificitet osv. Det er derfor svært at standardiserer denne type analyse. Man må ikke basere klinisk bedømmelse kun på analyseresultatet fra denne test. I stedet for skal analyseresultatet anvendes sammen med andre relevante parametre, ikke mindst almindelige kliniske (symptomer osv.) for korrekt at bedømme den specifikke kliniske situation. Det er kendt at sera fra patienter med andre autoimmune sygdomme og selv generelt raske personer kan vise krydsreaktivitet i analysen. Nogle individer kan med andre ord være positiv for anti-GBM uden at have klinisk tegn på sygdom. Samtidig ved man, at der også forekommer patienter med aktiv sygdom, som er negativ for anti-GBM. Immunsuppressiv behandling må ikke begyndes kun baseret på positivt anti-GBM resultat. Heller ikke må behandling påbegyndes eller ændres kun på grund af ændringer i anti-GBM titeren, men skal baseres på det totale kliniske billede.

Anti-GBM koncentrationen i et specifikt serum kan variere ved analyse med forskellige testmetoder. Dette beror primært på forskelle i reagensers egenskaber og specificitet/sensitivitet som forekommer mellem de forskellige kit fra forskellige fabrikanter.

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

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

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

KORTFATTET NORSK INSTRUKSJON

Bruksområde

Wieslab® anti-GBM-testsett er en ELISA-metode (enzyme-linked immunosorbent assay) for påvisning og semikvantisering av IgG-antistoffer mot glomerulær basalmembran (GBM) i humant serum. Assayet brukes til å påvise antistoffer i en enkelt serumprøve. Resultatene fra assayet skal brukes som en hjelp i diagnostiseringen av Goodpastures syndrom. Analysen bør utføres av opplært laboratoriepersonell. FOR BRUK VED IN VITRO DIAGNOSTISKE FORMÅL.

Advarsler og forsiktighetsregler

- For bruk ved in vitro diagnostiske formål.
 - Komponentene i det humane serumet som brukes i klargjøringen av kontrollene og kalibratorene i settet er blitt testet for tilstedeværelse av antistoffer mot human immunsviktvirus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatitt C (HCV) samt hepatitt B-overflateantigen etter FDA-godkjente metoder og funnet negative. Fordi ingen testmetoder kan gi fullstendig garanti om at HIV, HCV, hepatitt B-virus eller andre smittestoffer er fraværende, bør prøver og menneskebaserte reagenser håndteres som om de kan overføre smittestoffer.
 - Sentra for sykdomskontroll og forebygging og helsemyndighetene anbefaler at smittestoffer håndteres på sikkerhetsnivå (biosafety level) 2.
 - Alle løsninger inneholder ProClin 300 som konserveringsmiddel. Pipetter aldri med munnen og la aldri reagenser eller pasientprøver komme i kontakt med huden. Reagenser som inneholder ProClin kan være irriterende. Unngå kontakt med huden og øynene. Ved kontakt, skyll med store mengder vann.
 - Konsentrasjonene av anti-GBM i en gitt prøve som er fremkommet med assayer fra forskjellige produsenter kan variere på grunn av ulikheter i analysemetoder og reagensspesifisitet
- På forespørsel Euro Diagnostica gi HMS-datablad på alle farlige komponenter som inngår i settet.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Advarsel

Inneholder ProClin 300:
Reaksjonsmasse av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7]
and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

- H317: Kan utløse en allergisk hudreaksjon.
P264: Vask hendene grundig etter behandling.
P280: Bruk vernehansker/ verneklær / vernebriller / ansiktsskjerm .
P302+352: VED HUDKONTAKT: Vask grundig med såpe og vann.
P333+313: Ved hudirritasjon eller utslett: Søk legehjelp.

Innsamling av prøver

Anti-GBM-assayet er beregnet for bruk med serum. Håndteres som om de kan overføre smittestoffer. Unngå bruk av sera som er ikteriske, lipemiske og hemolyserte.

Varmedeaktivererte sera kan gi uspesifisert reaktivitet og bør ikke brukes.

Oppbevar serum mellom 2-8 °C hvis testing skal finne sted i løpet av fem dager. Hvis prøver skal oppbevares over lang tid, bør de oppbevares ved -20 °C eller kaldere. Frostfri fryser må ikke brukes fordi den kan la prøvene gå gjennom frysetiningssykluser og forringe antistoffene. Prøver som er ukorrekt oppbevart eller utsettes for flere frysetiningssykluser, kan gi falske resultater.

NCCLS gir anbefalinger for oppbevaring av blodprøver, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Komponenter i settet og oppbevaring av reagenser

- En ramme med remser (12x8) dekket med GBM-antigen (alfa 3-kjede) ett lokk forseglet i foliepakning med tørkepakke.

- 1,5 ml negativ kontroll (NC) som inneholder humant serum i fortynning.

- 1,5 ml positiv kontroll (PC) som inneholder humant serum i fortynning.

- 13 ml konjugat som inneholder alkaliske fosfatasemerkede antistoffer mot human IgG (blå farge).

- 2 x 32 ml fortynning (Dil) som inneholder PBS (rød farge).

- 13 ml substrat pNPP.

- 30 ml vaskeløsning konsentrert 30x.

- Fem kalibratører som inneholder humant serum i fortynning. 1,5 ml Cal 1 = 320 E/ml, 1,5 ml Cal 2 = 160 E/ml,

1,5 ml Cal 3 = 80 E/ml, 1,5 ml Cal 4 = 40 E/ml, 1,5 ml Cal 5 = 10 E/ml.

Alle reagenser i settet er klare til bruk, bortsett fra vaskeløsningen og bør oppbevares ved 2-8 °C.

Fjern bare det antall remser som er nødvendig for testing. Forsegle aluminiumspakningen nøye igjen.

Nødvendige materialer/utstyr som ikke følger med

- Mikroplateleser med filter, 405 nm.

- Presisjonspipetter med engangstupper.

- Vasker for remser, absorberende stoff, rør og en tidsmåler.

PROSEDYRE

Alle løsninger bør brukes ved romtemperatur. Inkuber alltid ved romtemperatur (20-25° C) med lokk.

Inkuber serumet i 30 minutter, konjuger i 30 minutter og aktiver substratet i 60 minutter (\pm 10 minutter).

Klargjøring av vaskeløsning

Dersom det observeres saltkrystaller i flasken med konsentrert vaskeløsning, plasseres flasken i et vannbad på 37°C til krystallene har løst seg opp før vaskeløsningen fortynnes. Fortynn 10 ml av den 30x konsentrerte vaskeløsningen i 290 ml destillert vann. Ved oppbevaring ved 2-8 °C er den fortyndede vaskeløsningen stabil til utløpsdatoen for settet.

Fortynning av serum og inkubasjon

Fortynn pasientserumet 1/80 med fortynning (395 μ l fortynning +5 μ l serum).

Pipetter 100 μ l/brønn fortynning i duplikat (som en blank), kalibrator 1, 2, 3, 4, 5, NC, PC og fortynt pasientserum (P) i henhold til skjemaet nedenfor. Inkuber i 30 minutter.

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

Etter seruminkubasjon

Vask 3 ganger med 300 µl vaskeløsning/brønn, ved å fylle og tømme brønnene hver gang; etter siste vasking tømmes brønnene ved å banke remsene mot det absorberende stoffet.

Tilsette konjugat

Tilsett 100 µl konjugat i hver brønn. Inkuber i 30 minutter.

Etter konjugatinkubasjon

Vask som tidligere.

Tilsette substratløsning

Tilsett 100 µl substrat pNPP i hver brønn, inkuber i 60 minutter (\pm 10 minutter).

Les av absorbansen ved 405 nm på en mikroplateleser.

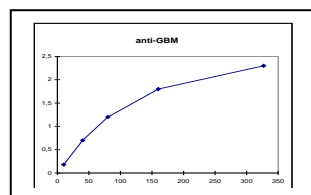
Beregninger

Trekk OD-verdien for den blanke fra de andre OD-verdiene.

Trekk opp en kalibratorkurve ved å plote OD mot E/ml-verdiene for de 5 kalibratorene. De fem kalibratorene som følger med, er tildelt vilkårlige verdier på 320 E/ml for kalibrator 1, 160 E/ml for kalibrator 2, 80 E/ml for kalibrator 3, 40 E/ml for kalibrator 4 og 10 E/ml for kalibrator 5. Les av E/ml-verdien for pasienten fra den opptrukne kurven. Verdier over 320 skal registreres som >320, eller analyseres på nytt med høyere fortykning.

Vilkårlig E/ml er innført av Wieslab® siden det ikke finnes noen generelt anerkjente internasjonale standarder for å uttrykke anti-GBM titre.

Eksempel:	Kalibrator	E/ml	Absorbans
	1	320	2.3
	2	160	1.8
	3	80	1.2
	4	40	0.7
	5	10	0.18



En prøve med en absorbansverdi på 0,7 vil avleses på X-aksen som å ha 40 E/ml anti-GBM.

Viktig: Kurven er et eksempel og må ikke anvendes for faktisk pasienttolking.

Kvalitetskontroll

OD for den negative kontrollen skal være under OD for kalibrator 5.

OD for kalibrator 1 skal være > 1,0

Verdien for den positive og negative kontrollen står på lot-etiketten.

De negative og positive kontrollene er beregnet på å overvåke betydelig reagensfeil. Den positive kontrollen vil ikke sikre presisjon ved cut-off for assayet. Det anbefales å analysere en ekstra kontroll ved cut-off for assayet.

Hvis noen av verdiene ikke ligger innenfor sine respektive områder, bør testen betraktes som ugyldig og testen gjennomføres på nytt. Flere kontroller kan testes i henhold til retningslinjene eller krav fra lokale eller statlige forskrifter eller godkjennelsesorganer. Se NCCLS C24-A for veiledning om korrekte kvalitetskontrollrutiner.

Tolking av resultatene

< 10 E/ml = **Negativ**

10-20 E/ml = **Tvetydig**; test på nytt, hvis fremdeles tvetydig, test på nytt med en annen metode eller test en ny prøve

>20 E/ml = **Positiv**

Begrensninger

Den enkelte pasients antistofftiter kan ikke brukes som et mål på alvorlighetsgraden for en sykdom siden antistoffer fra forskjellige pasienter kan avvike fra hverandre med hensyn til affinitet. Derfor er det vanskelig å oppnå en absolutt standardisering av resultater.

Testen bør ikke brukes som det eneste grunnlaget for beslutninger om klinisk behandling, men bør brukes som et supplement til kliniske symptomer og resultater fra andre tilgjengelige tester.

Sera fra pasienter med andre autoimmune sykdommer og fra normale personer kan inneholde potensielt kryssreaktive autoantistoffer. Noen personer kan være positive for anti-GBM-antistoffer med få eller ingen tegn på klinisk sykdom. På den annen side kan noen pasienter med aktiv sykdom ha uoppdagede nivåer av disse antistoffene.

Immunsuppressiv behandling må ikke startes på grunnlag av et positivt anti-GBM-resultat. Oppstart eller endringer av behandling bør ikke baseres på endringer i anti-GBM-konsentrasjon alene, men på grundig klinisk observasjon.

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

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

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partinummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Wash solution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

KORTFATTAD SVENSK INSTRUKTION

Produktens användning

Wieslab® anti-GBM test kit är en *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* för bestämning och kvantifiering av IgG antikroppar riktade mot glomerulärt basalmembran i humant serum. Resultatet kan ge vägledning vid utredning av misstänkt Goodpasture Syndrom. Analysen skall utföras av behörig personal.

FÖR *IN VITRO* DIAGNOSTIK ANVÄNDNING.

Provtagning

Anti-GBM analysen är avsedd för serumprover. Tänk på att flera reagens och inte minst serumprovet potentiellt kan innehålla infektiösa agens. Analysera inte sera som är ikteriska, lipemiska eller hemolyserade. Värmeinaktiverat sera kan ge ospecifik reaktivitet och bör därför ej analyseras. Prover kan förvaras vid 2-8° C om analys sker inom några dagar. Långtidsförvaring skall ske vid -20° C eller kallare. Använd inte frysar med automatisk avfrostning då risk finns att prover tinar under avfrostningarna. Prover som förvarats oriktigt kan ge felaktiga resultat. NCCLS har gett ut rekommendationer på hur man förvarar blodprover (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Säkerhetsinformation

- Endast för *in vitro* diagnostik.
- Serum som använt vid preparation av kontroller och kalibratorer har testat negativt för antikroppar mot humant immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatit C (HCV) och hepatit B ytantigen. Tänk dock på att ingen metod kan helt garantera frånvaron av HIV, HCV, hepatit B virus, eller andra infektiösa agens. Alla humana prov måste därför betraktas som potentiellt infektiösa och hanteras med försiktighet.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) och National Institutes of Health (NIH) i USA rekommenderar att potentiellt infektiösa material hanteras i enlighet med Biosafety Level 2.
- Alla lösningar innehåller ProClin 300 som konserveringsmedel. Pipettera aldrig med munnen. Undvik att få reagens eller patientprov direkt på huden. Reagens med ProClin 300 är irriterande och därför skall kontakt med hud och ögon undvikas. I händelse av att reagens kommit i kontakt med hud eller ögon, skölj med stora mängder vatten.
- På begäran kan Euro Diagnostica tillhandahålla säkerhetsdatablad om alla farliga komponenter som ingår i kitet.



BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	+
CONTROL	-
SUBS	pNPP

Varning

Innehåller ProClin 300:
Reaktionsmassa bestående av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Kan orsaka allergisk hudreaktion.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansikts-skydd.
P302+352:	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
P333+313:	Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.

Nödvändig utrustning och material som ej ingår i kitet

- Spektrofotometer med filter för 405 nm.
- Precisionspipetter med engångsspetsar.
- Tvättmaskin för mikrotiterplattor, torkpapper, provrör, timer

Ingående reagens och förvaring

- En ram med strips (12x8 brunnar) belagda med GBM antigen, ett lock. Allt förpackat i en återförslutningsbar foliepåse med torkmedel.
 - 1,5 mL negativ kontroll (NC), humant serum färdigspätt i "diluent".
 - 1,5 mL positiv kontroll (PC), humant serum färdigspätt i "diluent".
 - 13 mL konjugatlösning, alkaliskt fosfatas-märkta anti-IgG antikroppar spädda i PBS med proteinstabilisator (blå färg).
 - 2 x 32 mL spädningslösning "Diluent"(Dil), PBS (röd färg).
 - 13 mL substratlösning med pNPP.
 - 30 mL tvättlösning, 30x koncentrerad.
 - fem kalibratorer med utspätt humant serum. 1,5 mL Cal 1 : 320 E/ml, 1,5 mL Cal 2 : 160 E/ml, 1,5 mL Cal 3 : 80 E/ml, 1,5 mL Cal 4 : 40 E/ml, 1,5 mL Cal 5 : 10 E/ml. Färdiga att använda.
- Alla reagens i kitet är färdiga att använda utom tvättlösningen. Förvara kitet i kyl (+ 2-8° C). Tag endast ut det antal strips som behövs. Resten skall förvaras i aluminiumpåsen som förvaras tillsluten.

TESTPROCEDUR

Alla lösningar skall vara rumstempererade innan man använder dem. Alla inkubationer skall ske vid rumstemperatur (20-25° C). Använd lock för att undvika avdunstning. Följande inkubationstider gäller: provinkubationen 30 minuter, inkubation med konjugat 30 minuter, substratinkubation 60 minuter (\pm 10 minuter).

Beredning av tvättlösning

Om saltkristaller observeras i flaskan med koncentrerad tvättlösning, placeras flaskan i 37 °C vattenbad tills kristallerna är upplösta, detta görs innan utspädning av tvättlösningen. Späd 10 mL av den 30x koncentrerade tvättlösningen med 290 mL destillerat vatten. Den spädda tvättlösningen håller till kittets utgångsdatum om man förvarar den vid 2-8° C.

Provspädning och inkubationstider

Späd patientprovet 1/80 med spädningsbuffert (395 μ L diluent +5 μ L serum). Pipettera 100 μ L/brunn i duplikat av följande: diluent (blankvärde), Kalibrator 1, 2, 3, 4, 5, NC, PC and patientprov (P) enligt nedanstående schema. Inkubera i 30 minuter med lock.

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

Efter provinkubering / Tillsättning av Konjugat

Tvätta 3 gånger med 300 μ L tvättlösning / brunn, var noga med att helt tömma och fylla brunnarna i varje tvättcykel. Efter sista tvätten skall alla rester av vätska avlägsnas genom att slå mikrotiterstripsen mot ett absorberande papper.

Tillsätt 100 μ L konjugatlösning till varje brunn. Inkubera i 30 minuter.

Efter konjugatinkubering

Tvätta som tidigare.

Tillsättande av substratlösning

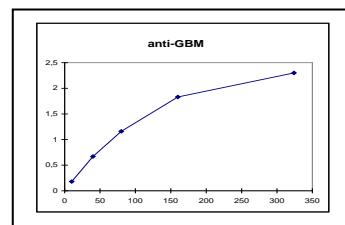
Tillsätt 100 μ L substratlösning i varje brunn, inkubera i 60 minuter (\pm 10 minuter). Avläs absorbansen i en spektrofotometer vid 405 nm.

Beräkningar

Dra ifrån blankens absorbans från alla övriga provers absorbans.

Rita en kalibreringskurva genom att plotta de 5 kalibratorernas OD värden mot deras respektive givna arbiträra E/ml. De 5 kalibratorerna har följande arbiträra värden: kalibrator 1: 320 E/ml, kalibrator 2 : 160 E/ml, kalibrator 3 : 80 E/ml, kalibrator 4 : 40 E/ml, kalibrator 5 : 10 E/ml. Avläs patientprovets enhetsvärde från kurvan. Värden större än 320 skall anges som >320, alternativt kör om provet med högre provspädning. Testresultat anges i arbiträra E/ml angivna av Wieslab® då ingen erkänd internationell standard finns för att ange anti-GBM titrar

Exempel:	Kalibrator	E/ml	Absorbans
	1	320	2,3
	2	160	1,8
	3	80	1,2
	4	40	0,7
	5	10	0,18



Viktigt: Den visade kurvan är endast ett exempel och får inte användas för avläsning av patientprover.

Kvalitetskontroll

Den negativa kontrollens absorbans skall vara mindre än kalibrator 5.

Absorbansen för kalibrator 1 skall vara > 1,0

Enhetsvärdet för den positiva och negativa kontrollen se lot certifikatet. De negativa och positiva kontrollerna används för att kontrollera att kittet fungerar tekniskt. Om något/några värden inte faller inom angivet område bör testen ej godkännas och man skall göra om analysen. Ytterligare kontroller kan analyseras, om så krävs av lokala myndigheter. Rekommendationer angående kvalitetskontroll kan fås ur NCCLSs dokument C24-A.

Tolkning av resultaten

< 10 E/ml = **Negativ**

10-20 E/ml = **Gråzon/tvetydigt**; Testa om. Om samma resultat uppnås, använd en alternativ metod.

>20 E/ml = **Positiv**

Analysens begränsningar

En enskild patients antikroppstitrer kan inte användas för att bedöma graden av sjukdom då antikroppar från olika patienter skiljer sig med avseende på affinitet, specificitet etc. Det är därför svårt att standardisera denna typ av analys.

Man får inte basera kliniska bedömningar enbart med ledning av analysresultat från detta test. Istället skall analysresultatet användas tillsammans med andra relevanta parametrar, inte minst allmänkliniska (symptom etc), för att korrekt bedöma den specifika kliniska situationen. Det är känt att sera från patienter med andra autoimmuna sjukdomar och även generellt friska individer kan uppvisa viss korsreaktivitet i analysen. Vissa individer kan med andra ord vara positiva för anti-GBM antikroppar utan övriga kliniska belegg för sjukdom. Samtidigt vet man att det också förekommer patienter med aktiv sjukdom som är negativa för anti-GBM antikroppar. Immunosuppressiv behandling får inte påbörjas enbart baserat på ett positivt anti-GBM resultat. Inte heller får behandling initieras eller ändras enbart på grund av ändringar i titern av anti-GBM utan skall istället baseras på den totala kliniska bilden. Anti-GBM koncentrationen i ett specifikt serum kan variera efter analys med olika testmetoder. Detta beror primärt på skillnader i reagensers egenskaper och specificitet/sensitivitet som förekommer mellan kit från olika tillverkare.

REFERENCES. RÉFÉRENCES. REFERENCIAS. LITERATUR. BIBLIOGRAFIA. LITTERATUR. REFERANSER. REFERENSER

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

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de símbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Explicação dos símbolos Forklaring til symboler. Symboler som brukes på etiketter. Förklaringar till symboler.

	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Código do lote. Partnummer. Lot nummer. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Número catalogo. Katalognummer.
	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. . La data di scadenza. Prazo de validade. Utløbsdato. Utløpsdato. Använd före.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Limite de temperatura. Opbevaringstemperatur. Oppbevares ved. Förvaringstemperatur.
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Risco biológico. Biologisk risk.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Consultar as instruções de utilização. Se brugsanvisning. Se bruksanvisningen. Läs instruktionsmanualen.
	In vitro diagnostic medical device. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Producto sanitario para diagnóstico in vitro. In-vitro-Diagnostikum. Dispositivo medico-diagnostico in vitro. Dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i> . In Vitro medisinsk diagnoseutstyr. In vitro diagnostik medicinsk utrustning.
	Warning. Attention. Atención. Achtung. Attenzione. Atenção. Advarsel. Advarsel. Varning.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Fabricante. Fabrikant. Producent. Produsent. Tillverkare.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Inneholder tilstrækkelig for 96 test. Inneholder tilstrekkelig for 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive. Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika. Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. Medicinsk utstyr til in vitro-diagnostik, i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF. Medisinsk utstyr i samsvar med EU in vitro diagnostic directive 98/79/EF. Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene. Antigénio. Antigen. Antigen. Antigen.
DIL	Diluent. Diluant. Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Diluente. Fortynning. Diluent. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Konjugat. Coniugato. Conjugado. Konjugat. Konjugat. Konjugat.
BUF WASH 30X	Washsolution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Solução de lavagem concentrada 30x. Vaskebuffer 30x koncentreret.. Vaskebuffer, konsentrert 30 ganger. Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrat pNPP. Substrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Calibrador. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Contrôle. Controllo. Kontrolle. Controllo. Controllo. Kontroll. Kontroll. Kontroll.

EURO DIAGNOSTICA AB

Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden

Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88

E-mail: info@eurodiagnostica.com

www.eurodiagnostica.com