



ImmuGloTM
Anti- Glomerular Basement Membrane (GBM)
Test System

IVD
NÁVOD K POUŽITÍ



REF 1124 48 stanovení (8 x 6)

POUŽITÍ

Nepřímý imunofluorescenční (IFA) test k semikvantitativní detekci protilátek proti bazální membráně glomerulů v lidském séru.

ÚVOD

Rychle progresivní glomerulonefritida (RPGN) je klinický syndrom, který se vyvíjí v průběhu dnů nebo týdnů charakterizovaných krescentickou glomerulonefritidou, jak lze vidět na histopatologii ledvin. Prognóza je špatná, pokud není rozpoznána brzy a není zahájena vhodná léčba. RPGN může být hodnocena na základě nepřímých imunofluorescenčních sérologických testů a renálních biopsií hodnocených pomocí elektronového mikroskopu.

Při použití výše uvedených kritérií lze RPGN klasifikovat do:

A. Onemocnění zprostředkované imunitními komplexy, charakterizované přítomností anti-DNA protilátek nebo anti-streptokokových protilátek.

B. Glomerulonefritida způsobená onemocněním glomerulární bazální membrány (GBM) a Goodpastureův syndrom.

C. Glomerulonefritida spojená s anti-neutrofilní cytoplazmatickou protilátkou (ANCA).

Ve studii Jayne et al¹, u 889 pacientů s podezřením na RPGN, mělo 47 (5%) anti-GBM, 246 (28%) mělo ANCA a 576 (65%) mělo jiné protilátky. 2% měly protilátky ANCA i anti-GBM. Frekvence anti-GBM protilátek a související nemoci jsou uvedeny v tabulce 1.

PRINCIP TESTU

Tato IFA metoda využívá pro zvýšení specifického fluorescenčního barvení nejprve tkáňový substrát, který je inkubován s antigen enhancing pufrem před inkubací s patientskými séry. Patientské séra se inkubují na substrátu opičích ledvin, aby byla umožněna vazba protilátek na substrát. Jakékoliv protilátky, které nejsou navázány, se odstraní promytím. Vázané protilátky třídy IgG jsou detekovány při inkubaci substrátu s fluoresceinem značeným konjugátem proti lidskému IgG. Reakce jsou pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem vybaveným vhodnými filtry.

Přítomnost reakcí anti-GBM protilátek je demonstrována jablečně zelenou fluorescencí bazální membrány ledvinných glomerulů. Titr (recipročně nejvyšší zředění s pozitivní reakcí) se poté stanoví sériovým ředěním.

SKLADOVÁNÍ A PŘÍPRAVA

Všechny reagensie skladujte při teplotě 2 - 8°C. Reagensie jsou připraveny k použití po vytemperování na laboratorní teplotu.

SOUČÁSTI SOUPRAVY

ImmuGlo™ anti-GBM (Primate Kidney) 1124

Kit obsahuje dostatečné množství reagensií pro provedení 48 stanovení.

8 x	SORB SLD 6	6 jamek se substrátem opičích ledvin.
1 x 0.5 ml	CONTROL + GBM	GBM Pozitivní kontrola.
		Obsahuje lidské sérum s GBM protilátkami.
1 x 0.5 ml	CONTROL - GBM	Negativní kontrola. Obsahuje lidské sérum.
1 x 5 ml	IgG CONJ. FITC EB*	Anti-lidský IgG FITC konjugát obsahující evansovu modř.
		Chraňte před světlem.
1 x 60 ml	BUF GBM	Pufr GBM pro ředění vzorků.
2 x	BUF WASH	Fosfátový pufr (PBS). Rozpusťte obsah vialky v 1 litru vody.
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM	Montovací medium. Nezmrazujte.
1 x 12	COVER SLD	Krycí sklíčka.

* Nahrazuje konjugát bez kontrastního efektu v kitech s kódy obsahujících EB

POŽADOVANÝ, ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL

Fluorescenční mikroskop
Micropipeta nebo Pasteurovy pipety
Sérologické pipety
Barvicí miska (např. Coplinova nádoba)
Malé zkumavky (např. 13 x 75 mm) a stojan na zkumavky
Deionizovaná nebo destilovaná voda
1 litrová nádoba
Promývací láhev
Absorpční papírové ručníky
Inkubační komůrka

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Pouze pro *in vitro* diagnostiku. Všechny použité lidské komponenty byly testovány na HbsAg, HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV-I a byly shledány negativní výsledky dle FDA. Se vzorky nakládejte jako s potenciálně biologicky nebezpečným materiálem. Postupujte dle správné laboratorní praxe při manipulaci, skladování, výdeji a likvidaci tohoto materiálu.

UPOZORNĚNÍ - Azid sodný (NaN₃) může reagovat s olovem a mědí za vzniku vysoce výbušných azidů. Při odstraňování kapalin vypláchněte vše velkým množstvím vody tak, aby se zabránilo nahromadění velkého množství azidu. Azid sodný může být po požití toxický. V případě požití okamžitě kontaktujte vedení laboratoře a lékaře.

Postupujte přesně dle uvedených instrukcí k zajištění platných výsledků. Nepoužívejte nebo nemíchejte reagensie z různých souprav a šarží.

Nepoužívejte po uplynutí doby expirace.

ODBĚR VZORKU A JEHO SKLADOVÁNÍ

Pouze vzorky séra by měly být použity pro tento postup. Silně hemolyzované, lipemické nebo mikrobiologicky kontaminované vzorky mohou ovlivnit výsledky tohoto testu, proto nemohou být použity. Vzorky mohou být skladovány při teplotě 2 - 8 °C maximálně 1 týden. Pro skladování po delší dobu sérum zamrazte a uchovejte při teplotě -20 °C. Rozmrazené vzorky znovu nezmrazujte.

POSTUP

Metoda testování

A. Screening

1. Naředte každé sérum pacienta v poměru **1:10** ředícím pufrem **Buffered Diluent** (0.1 ml séra + 0.9 ml Diluentu). **Neředte** Pozitivní ani Negativní kontroly! Uložte neředěné sérum pro případné stanovení titrů protilátek, pokud bude screeningový test pozitivní.
2. Sáčky obsahující sklíčka nechte temperovat při laboratorní teplotě 10-15 minut. Opatrně vyjměte sklíčka, nedotýkejte se přitom substrátu!
3. Sklíčka označte a umístěte je do inkubátoru na papírový ručník navlhčený vodou, aby se zabránilo vysychání.
4. Pipetujte 1 až 2 kapky **Antigen Enhancing Buffer** do každé jamky. Inkubační komoru uzavřete víkem a inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě.
5. Vyjměte sklíčko z inkubační komůrky, držte jej za okraj a jemně **promyjte** asi 10 ml **PBS** za pomoci pipety nebo promyjte sklíčko v kádince s PBS. Nepoužívejte promývací láhev. Poté ihned přeneste sklíčko do Coplinovy nádoby a promývejte 10 minut PBS. Proces opakujte u všech sklíček.
6. Vyjměte sklíčko z Coplinovy nádoby. Umístěte sklíčko do inkubační komůrky. Absorpčním papírem jemně vysušte přebytečný PBS ze sklíčka.
7. Obraťte lahvičku s kapátkem a jemně zmáčkněte pro nakápnutí 1 kapky (přibližně 50 µl) **negativní kontroly** do jamky č. 1 a 1 kapku **pozitivní kontroly** do jamky č. 2. Vyvarujte se přeplnění jamek.
8. Mikropipetou nebo Pasteurovou pipetou aplikujte **1 kapku** (přibližně 50 µl) naředěných patientských **sér** do ostatních jamek. Vyvarujte se přeplnění jamek.
9. Sklíčko inkubujte **30 minut** při laboratorní teplotě v inkubační komůrce zakryté víkem.
10. Vyjměte sklíčko z inkubační komůrky, držte jej za okraj a jemně **promyjte** asi 10 ml **PBS** za pomoci pipety nebo promyjte sklíčko v kádince s PBS. Nepoužívejte promývací láhev. Poté ihned přeneste sklíčko do Coplinovy nádoby a promývejte 10 minut PBS. Proces opakujte u všech sklíček.
11. Vyjměte sklíčko z Coplinovy nádoby. Absorpčním papírem vysušte přebytečné PBS z okraje sklíčka. Umístěte sklíčko do inkubační komůrky a ihned aplikujte **1 kapku** (přibližně 50 µl) **konjugátu** do každé jamky.
12. Přemístěte sklíčko do inkubační komůrky. **Inkubujte** po dobu **30 minut** při laboratorní teplotě.
13. Vyjměte sklíčko z inkubační komůrky, držte jej za okraj a jemně **promyjte** asi 10 ml **PBS** za pomoci pipety nebo promyjte sklíčko v kádince s PBS. Nepoužívejte promývací láhev. Umístěte sklíčko do nádobky naplněné PBS na **10 minut**. Opakujte postup u všech sklíček.

POZNÁMKA: Nesprávné promytí může vést ke zvýšení fluorescence na pozadí.

14. Vyjměte sklíčko z promývací nádoby. Absorpčním papírem vysušte přebytečné PBS z okraje sklíčka. Pro zabránění vysušení sklíčka pokračujte ihned dalším krokem, dokud je sklíčko mokré. Kápněte 3 kapky montovacího media na krycí sklíčko a opatrně převraťte na podložní sklíčko. Jemně přitlačte pro odstranění případných bublin. Zabraňte dalšímu pohybu krycího sklíčka.

15. Odečtěte a vyhodnoťte specifickou fluorescenci pod fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 200x nebo větším.

Sklíčka by měla být odečtena co nejdříve po provedení testu. Nicméně, vzhledem k přítomnosti krycí tekutiny v montovacím mediu, nedochází k žádné významné ztrátě intenzity barvení, jestliže dojde k odečtení do 48 hodin. Sklíčka musí být skladována při teplotě 2-8 °C ve tmě.

B. Endpoint stanovení (titrace)

Ředte dvojnásobnou ředící řadou začínající 1:10 (viz níže). Použijte jedno sklíčko, kde sérum může být ředěno v poměrech 1:10 až 1:320. V případě positivity u ředění 1:320, je titr vyhodnocen jako větší nebo roven 320. Další sklíčko může být použito pro určení endpointu při pozitivitě séra i při ředění 1:320. Převrácená hodnota nejvyššího ředění vytvářející pozitivní reakci je titrem.

Příprava ředění

Zkumavky označte čísly 1-6. Přidejte 0,9 ml Diluentu do zkumavky č. 1 a 0.2 ml do zkumavky č. 2-6. Pipetujte 0.1 ml neředěného séra do zkumavky č. 1 a důkladně promíchejte. Přeneste 0.2 ml ze zkumavky č. 1 do zkumavky č. 2 a důkladně promíchejte. Pokračujte přenesením 0.2 ml z jedné zkumavky do následující po promíchání tak, aby vzniklo ředění, které je znázorněno v následující tabulce.

Zkumavka	1	2	3	4	5	6
Sérum	0.1 ml					
Buffered Diluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Přenesení		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Výsledné ředění	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320

KONTROLA KVALITY

V každém testu by měla být zahrnuta pozitivní i negativní kontrola. Negativní kontrola by neměla ukázat žádnou specifickou fluorescenci ledvinných glomerulů, přičemž pozitivní kontrola by měla mít 2+ nebo vyšší barevnou intenzitu bazální membrány glomerulů. Jestliže nejsou získány tyto očekávané výsledky, měl by být proces zopakován. Pokud nadále dochází k selhání kontrol, může to být způsobeno:

- Zákalem - vyřadte kontrolu a použijte novou
- Problémy s optickým systémem fluorescenčního mikroskopu - nesprávné nastavení, žárovka za hranicí životnosti atd.
- Možné vyschnutí sklíčka během procesu

VÝSLEDKY

Výsledky testu pro anti-GBM protilátky by měly být interpretovány jako negativní (<10) nebo pozitivní vyšší nebo rovno 320 nebo nejlépe pozitivní se specifickým endpoint titrem. Odečítejte specifickou lineární imunofluorescenci bazální membrány glomerulů.

Specifická reakce protilátek je zobrazena v Tabulce 1 na konci tohoto dokumentu.

OMEZENÍ TESTU

V některých případech, séra pozitivní na anti-GBM protilátky mohou být buď velmi slabá nebo negativní při úvodním screeningovém ředění díky prozónovému efektu. V takovýchto nejasných případech by měla být séra vyšetřena při vyšších ředěních, a v případě positivity by měl být stanoven titer protilátek.

Přítomnost dvou a více protilátek v séru reagujících se substrátem může způsobit interferenci při jejich detekci imunofluorescencí. Tato interference může způsobit buď selhání detekce anti-GBM protilátky nebo potlačení titru v případě, že interferující protilátka má vyšší titer než anti-GBM protilátky.

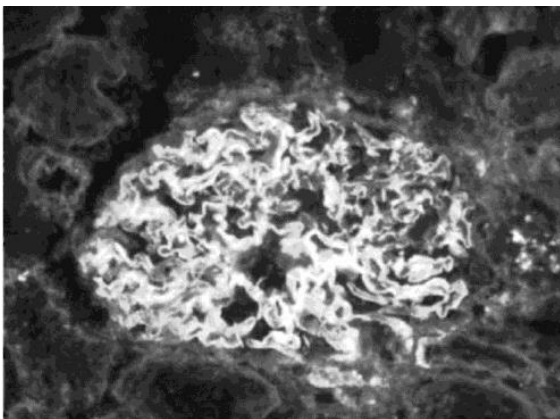
OČEKÁVANÉ HODNOTY

Anti-GBM protilátky reagují s glomerulární bazální membránou, tubulární bazální membránou nebo alveolární bazální membránou s kontinuálním a lineárním vzorem³. Anti-GBM protilátky jsou primárně třídy IgG. Přibližně 5% pacientů s rychle progresivní glomerulonefritidou (RPGN) je anti-GBM pozitivních¹. Goodpastureův syndrom (glomerulonefritida a plicní krvácení) představuje dvě třetiny pacientů pozitivních na anti-GBM protilátky. RPGN a mírnější formy glomerulonefritidy představují druhou třetinu. Občas mohou mít pacienti s anti-GBM protilátkami pouze plicní postižení⁴.

Anti-GBM protilátky jsou spojeny s Goodpastureovým syndromem a RPGN. Cirkulující protilátky proti GBM jsou přítomny u 90% pacientů s Goodpastureovým syndromem a u 60% pacientů s RPGN. Tyto protilátky mohou vymizet 4-8 měsíců po bilaterální nefrektomii⁵.

LITERATURA

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



Obrázek 1. Pozitivní GBM reakce na opičí ledvině, 200x. Imunofluorescence bazální membrány glomerulů.

Tabulka 1. Frekvence anti-GBM protilátek

Skupina onemocnění	% Pozitivních
Anti-GBM nefritida	100
Anti-TBM nefritida	0
Vaskulitida	0
Anafylaktoidní purpura	0
Systémový lupus erythematoses	0
Membranoproliferační glomerulonefritida	0
IgA nefropatie	0
Normál	0

Vyrábí:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120 USA

tel: (716) 691-0091

fax: (716) 691-0466

e-mail: info@immco.com

Dodává:

GALI spol. s r.o.

513 01, Semily, Ke Stadionu 179

tel: 481 689 050

fax: 481 689 051

e-mail: info@gali.cz

www.gali.cz



Pozor, čtěte návod



Číslo šarže



Použití pouze *in vitro*



Výrobce



Skladujte při uvedené teplotě



Pouze na 1 použití



Počet testů



Katalogové číslo



Datum výroby



Datum expirace



Diluent



Nebezpečí. Může způsobit rakovinu. Před použitím si přečtěte pokyny. Nepoužívejte, dokud nebudou přečtena a pochopena všechna bezpečnostní opatření. V PŘÍPADĚ ZASAŽENÍ NEBO POSTIŽENÍ: Vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv, ochranu očí, ochranu obličeje. Uchovávejte v uzamčeném prostoru. Likvidujte obsah / obal podle místních, státních a federálních předpisů.