



# ImmuGlo™ Anti-Glomerular Basement Membrane (GBM) Test System **IVD**

PRODUCT INSERT

**REF**      Code 1124      48 Determinations

## INTENDED USE

An indirect immunofluorescence (IFA) antibody test for the detection and semi-quantitation of anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies in human serum.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) is a clinical syndrome developing over days or weeks characterized by crescentic glomerulonephritis as seen by histopathology of the kidney. The prognosis is poor if not recognized early and if an appropriate treatment is not instituted. RPGN may be assessed based on indirect immunofluorescence serum studies and electron microscope evaluations of renal biopsies.

Using the above criteria RPGN may be classified into:

- Immune complex mediated disease characterized by the presence of anti-DNA antibodies or anti-streptococcal antibodies.
- Anti-glomerular basement membrane (GBM) mediated glomerulonephritis and Goodpasture's syndrome.
- Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) associated glomerulonephritis.

In a study by Jayne et al<sup>1</sup>, of 889 RPGN suspected patients, 47 (5%) had anti-GBM, 246(28%) had ANCA and 576(65%) had neither antibodies. 2% had both ANCA and anti-GBM antibodies.

## PRINCIPLES OF PROCEDURES

In this IFA method, to enhance the specific fluorescence staining, the tissue substrate is first incubated with an Antigen Enhancing Buffer prior to the incubation with patient sera. Patients' sera are incubated on monkey kidney substrate to allow binding of antibodies to the substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled, anti-human IgG conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters.

The presence of anti-GBM antibody reactions are demonstrated by an apple green fluorescence of the basement membrane of the kidney glomeruli.

The titer (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) is then determined by testing serial dilutions.

## PRODUCT INFORMATION

### Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.

### Materials Provided

ImmuGlo™ anti-Islet Cell IFA **REF** 1124

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

8 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b>	6 well <b>Monkey Kidney Substrate Slides</b>
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL</b> + <b>GBM</b> *	<b>GBM Positive Control.</b> Human serum containing GBM antibodies.
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL</b> - *	<b>Negative Control.</b> Contains human serum.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> *	<b>Anti-human FITC Conjugate.</b> Protect from light.
1 x 5.0 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> <b>EB</b> *†	<b>Anti-human FITC Conjugate with Evan's Blue.</b> Protect from light.
1 x 5.0 ml	<b>DIL-ENH</b> <b>GBM</b>	<b>Antigen enhancing buffer.</b>
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	<b>Sample Diluent.</b>
2 vials	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Phosphate Buffered Saline (PBS).</b> Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5.0 ml	<b>MOUNTING MEDIUM</b> *	<b>Mounting Medium.</b> Do not freeze.
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>	<b>Evan's Blue Counterstain.</b>
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	<b>Coverslips.</b> Reconstitute to one liter each.

\* Contains < 0.1% NaN<sub>3</sub>

† Replaces conjugate without counterstain in Code numbers containing "EB"

### Materials Required But Not Provided

Fluorescence microscope  
 Micropipette or Pasteur pipette  
 Serological pipettes  
 Staining dish (e.g. Coplin jar)  
 Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack  
 Distilled or deionized water  
 1 liter container  
 Wash bottle  
 Paper towels  
 Incubation chamber

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HbsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>22</sup>.

WARNING - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from IMMCO. Do not use beyond expiration date.

### SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

## PROCEDURE

### Test Method

#### A. Screening

1. Dilute each patient serum **1:10** with the Buffered Diluent provided (0.1 ml serum + 0.9 ml Diluent). **Do not** dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for **10-15 minutes**. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Pipet **1 to 2 drops** of **Antigen Enhancing Buffer** onto each well. Place the lid on the incubation chamber and incubate **30 minutes** at room temperature.
5. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10 ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides.
6. Remove slide from Coplin jar and shake off excess liquid and place the slide in the incubation chamber. Gently place blotter onto slide and press.
7. Invert dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50 µl) of the **Negative Control** to well #1. Similarly apply **1 drop** of **Positive Control** to well #2. Avoid overfilling the wells.
8. Using a micropipette or Pasteur pipette, apply **1 drop** of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
9. Place the lid on the incubation chamber and incubate **30 minutes** at room temperature.
10. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10 ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides.
11. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the **Conjugate** dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50 µl) to each well. Repeat process with all remaining slides.
12. Replace the lid on the incubation chamber and incubate **30 minutes** at room temperature.
13. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10 ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides.  
**NOTE:** Improper washing may lead to increased background fluorescence.
14. Remove a slide from the Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **While slide is still wet mount the coverslip.** Place **3 drops** of the Mounting Medium evenly spaced on a coverslip and invert the slide onto the coverslip. To remove any air bubbles gently apply pressure along the edge of the coverslip. Avoid any movement of the coverslip. Repeat process with all remaining slides
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of **200x** or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.




#### B: End Point Determination (Titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following **Steps 4 through 15** to determine the titer. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make

serial two-fold dilutions starting at 1:10 (see below). Using one slide, a serum may be tested at dilutions ranging from 1:10 to 1:320. If positive at a 1:320 dilution, the titer is reported as greater or equal to 320. Additional slides may be used to obtain endpoints for those sera still positive at a 1:320 dilution. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

### Preparation of Serial Dilutions

Number four tubes 1 through 6. Add 0.9 ml of Buffered Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 6. Pipette 0.1 ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2 ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2 ml from one tube to the next after mixing to yield the dilutions depicted in the following table:

<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Serum</b>	0.1 ml			
	+			
<b>Buffered Diluent</b>	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
				
<b>Transfer</b>		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
<b>Final dilution</b>	1:10	1:20	1:40	1:80 etc.

### QUALITY CONTROL

Both Positive and Negative Controls should be included with each test run. The negative control should show no specific fluorescence of the kidney glomeruli, whereas the positive control should have 2+ or greater staining intensity of the basement membrane of the kidney glomeruli.

If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control.
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope. These may include: improper alignment, use of the bulb beyond useful life expectancy, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.

### RESULTS

The results of the tests for anti-GBM should be reported as negative (<10), positive greater or equal to 320, or preferably, positive with titer.

Read for specific linear basement membrane staining of the kidney glomeruli. See photo 1 at the end of this document.

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

In some cases, sera positive for anti-GBM antibodies may either be very weak or negative at the initial screening dilution (prozone phenomenon). In such doubtful cases the sera should be screened at higher dilutions and, if positive, antibody titers determined.

In some cases the presence of two or more antibodies in a serum which are reactive with the same substrate may cause an interference in their detection by immunofluorescence. This interference may cause either a failure to detect anti-GBM antibodies or a suppression of the titer if the interfering antibody has a higher titer than anti-GBM antibodies.

## **EXPECTED VALUES**

Anti-GBM antibodies react with the glomerular basement membrane, the tubular basement membrane or the alveolar basement membrane with a continuous and linear pattern<sup>3</sup>. The anti-GBM antibodies are primarily of the IgG class. Approximately 5% of the patients with rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) are anti-GBM antibody positive<sup>1</sup>. Goodpasture's Syndrome (glomerulonephritis and pulmonary hemorrhage) accounts for two thirds of the patients positive for anti-GBM antibodies. RPGN and milder forms of glomerulonephritis account for the other one third. Occasionally, patients with anti-GBM antibodies may have only lung involvement<sup>4</sup>.

Anti-GBM antibodies are associated with Goodpasture's syndrome and RPGN. Circulating anti-GBM antibodies are present in 90% of patients with Goodpasture's syndrome and 60% of patients with RPGN. These antibodies may disappear 4-8 months after bilateral nephrectomy<sup>5</sup>. See table 1 at the end of this document.



# ImmuGlo™ Anti-Membrana Basale del Glomerulo (GBM) Sistema

IVD

**IMMCO**  
**DIAGNOSTICS**

REF

1124

48 determinazioni

Dosaggio in immunofluorescenza indiretta per l'individuazione e la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi contro la membrana basale del glomerulo (GBM) nel siero umano.

## CARATTERISTICHE GENERALI

La glomerulonefrite progressiva (RPGN) è velocemente una sindrome clinica che sviluppa i giorni o le settimane eccessivi caratterizzati dalla glomerulonefrite a mezzaluna come visto dall'istopatologia del rene. La prognosi è povero se non riconosciuta presto e se un trattamento adatto non è istituito. RPGN può essere valutato ha basato sugli studi del siero di immunofluorescenza e sulle valutazioni indiretti del microscopio elettronico delle biopsie renali.

Usando i suddetti test di verifica RPGN può essere classificato in:

- Il complesso immune ha mediato la malattia caratterizzata dalla presenza degli anticorpi anti-DNA o degli anticorpi anti-streptococchi.
- la membrana anti-GBM ha mediato la glomerulonefrite e la sindrome del Goodpasteur.
- l'anticorpi ANCA ha associato la glomerulonefrite.

In uno studio da Jayne ed altri <sup>1</sup>, di 889 pazienti ritenuti sospetto RPGN, 47 (5%) hanno avuti anti-GBM, 246(28%) ha avuto ANCA e 576 (65%) non ha avuto anticorpi. 2% ha avuto sia ANCA che anticorpi del anti-GBM.

## PRINCIPIO DEL METODO

In questo metodo di immunofluorescenza, aumentare la reazione specifica di fluorescenza, il substrato in primo luogo è incubato con un antigene che aumenta l'amplificatore prima dell'incubazione con i sieri pazienti. Allora, I sieri dei pazienti vengono incubati su substrato del rene di topo per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Tutti gli anticorpi non legati vengono eliminati sciacquando il vetrino, mentre gli anticorpi legati del tipo IgG vengono individuati mediante incubazione del substrato con coniugato anti IgG umana, marcato con fluoresceina. Per osservare le reazioni si utilizza un microscopio a fluorescenza dotato di filtri adatti. Una fluorescenza verde mela la membrana basale dei glomeruli del rene di conferma la presenza di anti-GBM. Mediante l'analisi di diluizioni seriali si determina quindi il titolo (il reciproco della diluizione più elevata che causa una reazione positiva).

## CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

### Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a una temperatura di 2-8°C. I reagenti sono pronti per l'uso dopo averli portati a temperatura ambiente.

## Materiali forniti

ImmuGlo™ GBM IFA **REF** 1124

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 48 determinazioni ciascuno.

8 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>6</b>	<b>Vetrini-substrato di sezioni del rene di topo con 6 pozzetti</b>
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>GBM</b> *	<b>Controllo positivo GBM</b> , siero umano. Contiene GBM, standardizzato nelle unità di JDF.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	<b>Controllo negativo</b> , siero umano
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> *	<b>Coniugato FITC IgG</b> . Tenere lontano dalla luce.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> <b>EB</b> *	<b>Coniugato FITC IgG con Blu di Evans</b> . Tenere lontano dalla luce.
1 x 5 ml	<b>DIL-ENH</b> <b>GBM</b>	<b>Tampone de contrasto</b> .
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	<b>Diluyente per campioni</b>
2 flaconcini	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Tampone fosfato-salino (PBS)</b> . Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING MEDIUM</b> *	<b>Mezzo Montante</b> . Non congelare.
1 x 1,0 ml	<b>EVANS</b>	<b>Blu di Evans</b>
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	<b>Vetrini coprioggetto</b>

\* Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>

† Sostituisce il coniugato senza Blu di Evans nei numeri di codice che contengono "EB"

## Materiali necessari ma non forniti

Microscopio a fluorescenza  
Micropipetta o pipetta Pasteur  
Pipette sierologiche  
Piastra di colorazione (ad esempio vaschetta di Coplin)  
Piccole provette (ad es. 13 x 75 mm) e porta provette  
Acqua distillata o deionizzata  
Contenitore da 1 litro  
Bottiglia di lavaggio  
Carta assorbente  
Incubatore

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato controllato ed è risultato negativo ai test richiesti dalla FDA per la presenza dell'HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I. Tuttavia, maneggiare tutti i campioni di siero umano e i prodotti di origine umana come fonte potenziale di infezione, indipendentemente dalla loro origine, seguendo le normali pratiche di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e l'eliminazione di questi materiali<sup>14</sup>. ATTENZIONE - La sodio azide (NaN<sub>3</sub>) può dar luogo a reazioni chimiche pericolose. Per lo smaltimento dei residui delle analisi attenersi scrupolosamente alle norme CDC e alle norme di legge in materia. La sodio azide è tossica,

se ingerita; in questo caso, informare immediatamente il responsabile del laboratorio o un centro per casi di avvelenamento.

Al fine di assicurare risultati validi, si raccomanda di attenersi alle istruzioni riportate in questo inserto. Non scambiare i componenti del kit se non con quelli aventi lo stesso numero di catalogo della IMMCO. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

## PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare soltanto campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o contaminati possono influenzare i risultati del test e vanno scartati. Conservare i campioni a una temperatura di 2-8°C per non oltre una settimana. Per periodi di conservazione più lunghi, congelare il siero a -20°C, evitando di congelare i campioni più volte.

## PROCEDURA

### Metodica d'analisi

#### A. Screening

1. Diluire ciascun siero di paziente 1:10 con il Diluente per Campioni fornito (0,1 ml di siero + 0,9 ml di Diluente). **Non diluire i Controlli Positivi o Negativi.** Conservare i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che i sacchetti contenenti i vetrini-substrato raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti, quindi estrarre i vetrini facendo attenzione a non toccare il substrato.
3. Marcare i vetrini e porli in una camera umida.
4. Con una micropipetta o con la pipetta Pasteur, versare 1-2 gocce del tampone de contrasto negli altri pozzetti. Mettere il coperchio sulla camera umida ed incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
5. Togliere un vetrino dalla camera umida. Tenendo il vetrino per l'estremità della linguetta, sciacquarlo delicatamente con circa 10 ml di PBS utilizzando una pipetta o sciacquarlo in un becher pieno di PBS. Non utilizzare la bottiglia di lavaggio. Trasferire il vetrino immediatamente nella vaschetta di Coplin e lavare per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
6. Capovolgere il flaconcino contagocce e versare delicatamente 1 goccia (circa 50 µl) del Controllo Negativo nel pozzetto no. 1. Allo stesso modo versare 1 goccia del Controllo Positivo nel pozzetto no. 2, evitando di riempire eccessivamente i pozzetti.
7. Con una micropipetta o con la pipetta Pasteur, versare 1 goccia del siero diluito del paziente (circa 50 µl) negli altri pozzetti, evitando di riempirli eccessivamente.
8. Mettere il coperchio sulla camera umida ed incubare i vetrini per 18-24 ore a temperatura ambiente.
9. Togliere un vetrino dalla camera umida. Tenendo il vetrino per l'estremità della linguetta, sciacquarlo delicatamente con circa 10 ml di PBS utilizzando una pipetta o sciacquarlo in un becher pieno di PBS. Non utilizzare la bottiglia di lavaggio. Trasferire il vetrino immediatamente nella vaschetta di Coplin e lavare per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
10. Togliere il/i vetrino/i dalla vaschetta di Coplin. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Porre il vetrino nella camera umida. Capovolgere immediatamente il flaconcino contagocce del Coniugato FITC e versarne delicatamente 1 goccia (circa 50 µl) in ciascun pozzetto. Ripetere i punti 7 e 8 per ciascun vetrino.
11. Riporre il coperchio sulla camera umida ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
12. Ripetere i punti 7-9 con il Coniugato B al posto di Coniugato FITC.
13. Togliere un vetrino dalla camera umida e tenendolo per l'estremità della linguetta, immergerlo in un becher pieno di PBS per togliere il coniugato in eccesso. Porre il/i vetrino/i in una piastra di colorazione piena di PBS per 10 minuti. Se si desidera, si possono aggiungere 2-3 gocce di Blu di Evans al lavaggio finale. Ripetere per gli altri

- vetrini. NOTA: Un lavaggio scorretto può aumentare la fluorescenza della priorità bassa.
14. Togliere un vetrino dalla piastra di colorazione. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Per evitare che il vetrino si secchi, passare immediatamente al punto 13 mentre è ancora bagnato.
  15. Montare il vetrino coprioggetto versando delicatamente 3 **gocce** uniformemente di Terreno di allestimento su vetrino coprioggetto, quindi porre il coprioggetto sul vetrino. Non applicare eccessiva pressione ed evitare che il coprioggetto si sposti lateralmente.
  16. Ripetere i punti 12 e 13 per ciascun vetrino.
  17. Esaminare la fluorescenza specifica con un microscopio a fluorescenza a un ingrandimento di almeno 200x.

I vetrini si possono leggere appena vengono preparati. Tuttavia, grazie a un agente anti evanescenza presente nel liquido di montaggio, non si verifica alcuna perdita significativa di intensità di colorazione, se la lettura viene posticipata fino a 48 ore. I vetrini devono essere conservati al buio a una temperatura di 2-8°C.

### B. Determinazione dell'endpoint (Titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere ulteriormente analizzato seguendo i punti 4 - 17 per determinarne il titolo. Ciascuna sessione analitica deve includere i Controlli Positivi e Negativi. Effettuare diluizioni seriali doppie partendo da 1:10. Il reciproco della diluizione più elevata che produce una reazione positiva è il titolo.

### Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare quattro provette da 1 a 4. Aggiungere 0,9 ml di Diluente per Campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle provette da 2 a 4. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e mescolare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta all'altra dopo aver mescolato per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

Provette	1	2	3	4
Siero	0,1 ml			
	+			
Diluente tamponato	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻
Trasferimento		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluizione finale	1:10	1:20	1:40	1:80 etc.

### CONTROLLO DI QUALITA'

Ciascuna sessione analitica deve comprendere sia un Controllo Positivo che uno Negativo. Il Controllo Negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza specifica dei glomeruli del rene, mentre il Controllo Positivo deve avere un'intensità di colorazione della membrana basale dei glomeruli del rene di almeno 2+ con il controllo positivo GBM.

Se non si ottengono i risultati attesi, bisognerà ripetere l'analisi. Se continuano a verificarsi risultati inadeguati con i controlli, le cause possono essere:

- Torbidità. Scartare e utilizzare un altro controllo.
- Problemi al sistema ottico del microscopio a fluorescenza, quali allineamento non corretto, bulbo scaduto, ecc.
- Essiccamento del vetrino durante la procedura.

### RISULTATI

I risultati delle prove per anti-GBM dovrebbero essere segnalati come la negazione (< 10), più grande o uguale positivo a 320, o preferibilmente, positivo con il titolo.

Colto per reazione lineare specifica della la membrana basale dei glomeruli del rene.

NOTA: Le reazioni di ICAb sono, per la loro natura, molto più deboli delle reazioni per ANA o la maggior parte delle altre reazioni dell'anticorpo di immunofluorescenza. Vedere la foto 1 all'estremità di questo documento.

### LIMITI DELLA PROCEDURA

In alcuni casi, i sieri positivi per gli anticorpi del anti-GBM possono essere molto deboli o negazione alla diluizione iniziale della selezione (fenomeno di prozone). In tali casi dubbiosi i sieri dovrebbero essere selezionati alle più alte diluizioni e, se positivo, ai titoli dell'anticorpo determinati.

In alcuni casi la presenza di due o più anticorpi in un siero che sono reattivi con lo stesso substrato può causare un'interferenza nella loro rilevazione dall'immunofluorescenza. Questa interferenza può causare un'omissione di rilevare gli anticorpi del anti-GBM o una soppressione del titolo se l'anticorpo interferente ha un più alto titolo che gli anticorpi del anti-GBM.

### VALORI ATTESI

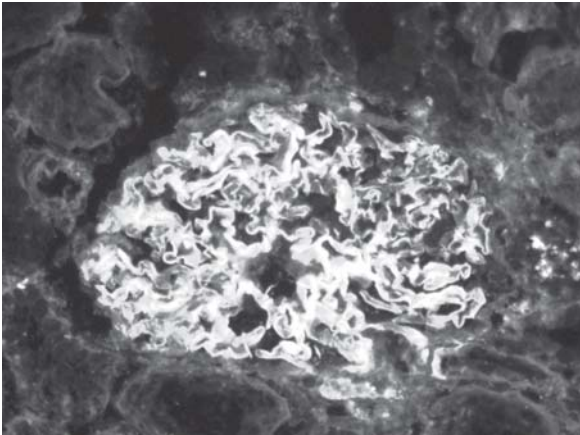
Gli anticorpi di anti-GBM reagiscono con la membrana glomerulare dello scantinato, la membrana tubolare dello scantinato o la membrana alveolare dello scantinato con un modello continuo e lineare <sup>3</sup>. Gli anticorpi del anti-GBM sono soprattutto del isotipo IgG. Circa 5% dei pazienti con la glomerulonefrite velocemente progressiva (RPGN) sono positivo dell'anticorpo del anti-GBM<sup>1</sup>. La sindrome del Goodpasture rappresenta 66% dei pazienti positivi per gli anticorpi del anti-GBM. RPGN e le forme più delicate della glomerulonefrite rappresentano 33%. Occasionalmente, i pazienti con gli anticorpi del anti-GBM possono avere soltanto partecipazione del polmone<sup>4</sup>.

Gli anticorpi di anti-GBM sono associati con la sindrome del Goodpasture e RPGN. Gli anticorpi circolanti del anti-GBM sono presenti in 90% dei pazienti con la sindrome del Goodpasture ed in 60% dei pazienti con RPGN. Questi anticorpi possono sparire 4-8 mesi dopo il nefrectomia bilaterale <sup>5</sup>. Vedere la tabella 1 all'estremità di questo documento.

### REFERENCES • REFERENCIAS • LITERATUR • RIFERIMENTI

1. Jayne DRW, Marshall PD, Jones SJ and Lockwood CM. Autoantibodies to GBM and neutrophil cytoplasm in rapidly progressive glomerulonephritis. *Kidney Int* **37**:965-970, 1990.
2. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control, National Institute for Health.(HHS Pub. No {CDC} 93-8395) 1993.
3. Wilson CB. Radioimmunoassay for anti-glomerular basement membrane antibodies. In "Manual of Clinical Immunology," Rose N and Friedman H (Eds), 2nd ed, ASM, pp 376-379, 1980.
4. Wilson CB and Dixon FJ. Renal injury from immune reactions involving antigens in or of the kidney. In "Contemporary Issues in Nephrology", Wilson CB, Brenner BM and Stein JH (Eds), Vol 3, Churchill Livingstone, New York, pp 35-66, 1979.
5. Jenis EM and Lowenthal DT. *Kidney Biopsy Interpretation*. FA Davis Co. Philadelphia, 1977.
6. Fish AJ, Kleppel M, Jeraj K and Michael AF. Enzyme immunoassay of anti-glomerular basement membrane antibodies. *J Clin Med* **105**:700-705, 1985.

**Photo 1.** Positive GBM staining reaction on monkey kidney, 200X.  
Note staining of the basement membrane of the glomeruli.



**Table 1.** Frequency of Anti-GBM Antibodies

Disease Group	% Positive
Anti-GBM nephritis	100
Anti-TBM nephritis	0
Vasculitis	0
Anaphylactoid purpura nephritis	0
Systemic lupus erythematosus	0
Membranoproliferative glomerulonephritis	0
IgA nephropathy	0
Normals	0

Adapted from Fish AJ et al.<sup>6</sup>

*For technical assistance please contact:*



**IMMCO**  
**DIAGNOSTICS**

**IMMCO Diagnostics, Inc.**

**60 Pineview Drive**

**Buffalo, NY 14228-2120**

**Telephone: (716) 691-0091**

**Fax: (716) 691-0466**

**Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST**

**E-Mail: [info@immcodiagnostics.com](mailto:info@immcodiagnostics.com)**

*or your local product distributor*



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante  
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)