

# CHORUS



# GBM

**REF 86070**

DIESSE Diagnostica Senese  
S.p.A.

**REF 86070/12**

Via delle Rose, 10  
53035 Monteriggioni (Siena)  
Italy

	Capitolo Section Capítulo
Modifiche introdotte nella revisione corrente Changes introduced in the current revision Cambios introducidos en la revisión actual Alterações introduzidas na revisão atual	<b>REF</b> – 5 – 6





## ISTRUZIONI PER L'USO

### **CHORUS GBM**

#### **Per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgG anti-proteina di Membrana Basale Glomerulare (GBM)**

#### **Solo per uso diagnostico *in vitro***

##### **1. UTILIZZAZIONE**

**Metodo immunoenzimatico per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi di classe IgG anti-proteina di Membrana Basale Glomerulare (GBM) nel siero umano con dispositivo monouso applicato agli strumenti Chorus e Chorus TRIO.**

##### **2. INTRODUZIONE**

La sindrome di Goodpasture è una malattia autoimmune dei reni, così denominata in seguito agli studi condotti da Ernest Goodpasture, che fu il primo a descrivere la coesistenza di una emorragia polmonare letale associata ad una glomerulonefrite proliferativa.

Oggi tale sindrome viene considerata una malattia autoimmune costituita dalla triade di glomerulonefrite, emorragia polmonare e formazione di anticorpi diretti verso la membrana glomerulare basale. L'incidenza di tale sindrome varia da circa 0.5 ad 1 caso/milione di persone all'anno. Essa rappresenta una grave emergenza medica con un'incidenza di decesso del 75 - 90 %, se non viene trattata, a causa dell'insufficienza renale e respiratoria. La disfunzione è caratterizzata istologicamente dalla formazione lineare continua di immunoglobuline lungo la membrana glomerulare basale (GBM). L'immunofluorescenza diretta su biopsie renali può essere utilizzata per evidenziare tale deposizione. Oggi il metodo sierologico in uso è costituito dalla determinazione degli autoanticorpi diretti al terminale-C della catena  $\alpha$ -3 del collagene tipo VI.

Le membrane glomerulari basali (GBM) costituiscono una barriera anatomica laddove il tessuto epiteliale viene a contatto con il tessuto connettivale. Il collagene di tipo VI è esclusivo per il GBM e forma una matrice nella quale vengono integrate altre molecole (e.g. Laminina, Entactina). Delle sei catene- $\alpha$  (polipeptidi con più di 1650 aminoacidi), tre formano una triplice elica e caratterizzano le subunità strutturali del collagene di tipo IV.

Gli autoanticorpi specifici anti-GBM di Goodpasture sono diretti verso il dominio NC1 di 29 kDa della catena  $\alpha$ -3 del collagene di tipo VI della GBM. In seguito alla caratterizzazione dell' antigene, la diagnosi oggi viene

stabilita attraverso la dimostrazione delle tre disfunzioni: glomerulonefrite, emorragia polmonare ed anticorpi diretti alla catena  $\alpha$ -3 del collagene di tipo VI della GBM.

##### **3. PRINCIPIO DEL METODO**

Il dispositivo Chorus GBM è pronto all'uso per la determinazione degli anticorpi IgG anti-proteina di Membrana Basale Glomerulare (GBM), negli strumenti Chorus/Chorus TRIO.

Il test si basa sul principio ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). L'antigene viene legato alla fase solida. Le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene in seguito ad incubazione con siero umano diluito. Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi anti-immunoglobuline umane coniugate con perossidasi di rafano. Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi. Il colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

I dispositivi monouso contengono tutti i reagenti per eseguire il test negli strumenti Chorus/Chorus TRIO.

I risultati sono espressi in Unità Arbitrarie (AU/ml).

##### **4. PRECAUZIONI**

#### **SOLO PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.**

**Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HBsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.**

**Smaltimento dei residui: i campioni di siero, i calibratori e le strip usate devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di leggi vigenti.**

#### **Avvertenze per la sicurezza personale**

1. Non pipettare con la bocca.
2. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni.
3. Lavare accuratamente le mani una volta inseriti i dispositivi nello strumento Chorus/Chorus TRIO.
4. In merito alle caratteristiche di sicurezza dei reagenti contenuti nel kit consultare la Scheda di Sicurezza (disponibile su richiesta).
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.

6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere decontaminata, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per decontaminare eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

#### **Avvertenze analitiche**

Prima dell'uso, portare i dispositivi da utilizzare a temperatura ambiente (18-30°C) ed impiegare entro 60 minuti.

- Scartare i device con substrato (pozzetto 4) colorato di blu**
- Nell'aggiungere il campione al pozzetto verificare che sia perfettamente distribuito sul fondo.
- Controllare l'effettiva presenza dei reagenti nel dispositivo e l'integrità del dispositivo stesso. Non utilizzare dispositivi che al controllo visivo presentano mancanza di qualche reagente e/o corpi estranei nel pozzetto di reazione.
- I dispositivi devono essere utilizzati insieme allo strumento Chorus/Chorus TRIO, seguendo rigorosamente le Istruzioni per l'Uso ed il Manuale Utente dello strumento.
- Controllare che lo strumento Chorus/Chorus TRIO sia impostato correttamente (vedi Manuale Utente).
- Non alterare il codice a barre posto sulla impugnatura del device al fine di permetterne la corretta lettura da parte dello strumento.
- Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni.
- Codici a barre difettosi possono essere inseriti manualmente nello strumento (vedi Manuale Utente).
- Non esporre i dispositivi a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e l'uso.
- Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, lipemici, itterici, di siero non completamente coagulato o di campioni che presentano inquinamento microbico.
- Non utilizzare il dispositivo dopo la data di scadenza
- Controllare che lo strumento abbia la connessione con la Washing Buffer Autoimmunity (Ref. 86004)**

#### **5. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI**

Il kit è sufficiente per 36 determinazioni (REF 86070).

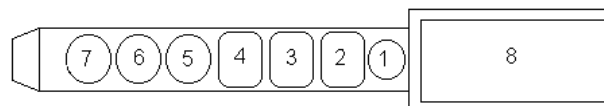
Il kit è sufficiente per 12 determinazioni (REF 86070/12).

#### **DD** DISPOSITIVI

6 confezioni da 6 dispositivi ciascuna (REF 86070).

2 confezioni da 6 dispositivi ciascuna (REF 86070/12).

Descrizione:



**Posizione 8:** Spazio disponibile per etichetta con codice a barre

**Posizione 7:** Vuota

**Posizione 6:** POZZETTO DI MICROPIASTRA

Sensibilizzato con proteina di Membrana Basale Glomerulare

**Posizione 5:** POZZETTO DI MICROPIASTRA

Non sensibilizzato.

**Posizione 4:** SUBSTRATO TMB

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL ed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)

**Posizione 3:** DILUENTE PER I CAMPIONI

Contenuto: soluzione proteica salina contenente Proclin (0.1%)

**Posizione 2:** CONIUGATO

Contenuto: anticorpi monoclonali anti-IgG umane marcati con perossidasi, in soluzione tampone fosfato contenente fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%.

**Posizione 1:** POZZETTO VUOTO

Dove l'utilizzatore deve dispensare il siero non diluito.

**Uso: equilibrare una busta a temperatura ambiente**, aprire la busta, prelevare i dispositivi occorrenti; riporre gli altri nella busta contenente il gel di silice, far uscire l'aria e **sigillare** premendo sulla chiusura. Conservare a 2/8°C.

**CALIBRATOR** CALIBRATORE 1 x 0.175 ml

Contenuto: Siero umano diluito contenente anticorpi IgG anti-proteina di Membrana Basale Glomerulare (GBM) e conservante. Liquido, pronto all'uso.

**CONTROL +** CONTROLLO POSITIVO 1 x 0.425 ml

Contenuto: Siero umano diluito contenente anticorpi IgG anti-proteina di Membrana Basale Glomerulare (GBM) e conservante. Liquido, pronto all'uso.

#### **ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO:**

- WASHING BUFFER AUTOIMMUNITY (REF) 86004
- CLEANING SOLUTION 2000 (REF) 83609
- SANITIZING SOLUTION (REF) 83608 - 83604
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT (REF) 83607
- Strumento Chorus/Chorus TRIO
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente volumi di 50-200 µl.
- Guanti monouso
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti

#### **6. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI**

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C. Nel caso di un'errata temperatura di conservazione deve essere ripetuta la calibrazione e controllata la correttezza del risultato tramite il siero di controllo (vedi capitolo 9: Validazione del test).

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

I reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

DISPOSITIVI	8 settimane a 2/8°C
CALBRATORE	8 settimane a 2/8°C
CONTROLLO POSITIVO	8 settimane a 2/8°C

## 7. TIPO DI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato come richiesto nelle procedure standard di laboratorio.

Non sono conosciute le conseguenze dell'utilizzo di altri liquidi biologici.

Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C; per periodi di conservazione maggiori, congelare a -20°C.

Il campione può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti.

Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. Dopo lo scongelamento agitare con cura il campione prima del dosaggio.

L'inattivazione al calore può fornire risultati erronei.

La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erronei.

## 8. PROCEDIMENTO

1. Aprire la busta (lato contenente la chiusura a pressione), prelevare il numero di dispositivi necessario per eseguire gli esami e conservare gli altri richiudendo la busta dopo aver fatto uscire l'aria.
2. Controllare visivamente lo stato del dispositivo secondo le indicazioni riportate nel capitolo 4 Avvertenze Analitiche.
3. Dispensare nel pozzetto n°1 di ciascun dispositivo 50 µl di siero non diluito da analizzare, ad ogni cambio di lotto utilizzare un dispositivo per il calibratore.
4. Introdurre i dispositivi sullo strumento Chorus/Chorus TRIO. Eseguire la calibrazione (se richiesto) ed il test come riportato nel Manuale di Istruzione dello strumento.

## 9. VALIDAZIONE DEL TEST

Utilizzare il siero di controllo positivo per verificare la correttezza del risultato ottenuto, processandolo come indicato nel Manuale Utente dello strumento. Se lo strumento segnala che il siero di controllo ha un valore fuori dal limite di accettabilità occorre effettuare nuovamente la calibrazione. I risultati precedenti verranno corretti automaticamente.

Se il risultato del siero di controllo continua ad essere fuori dall'intervallo di accettabilità, contattare il Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554

Fax: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

## 10. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Lo strumento Chorus/Chorus TRIO fornisce il risultato in Unità Arbitrarie (AU/ml) calcolate in base ad un grafico lotto-dipendente memorizzato nello strumento.

Il test sul siero in esame può essere interpretato come segue:

POSITIVO: quando il risultato è > 18.0

NEGATIVO: quando il risultato è < 12.0

DUBBIO/EQUIVOCO: quando il risultato è compreso fra 12.0 e 18.0

In caso di risultato dubbio/equivoco ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio/ equivoco, ripetere il prelievo.

## 11. LIMITAZIONI DEL TEST

Tutti i valori ottenuti necessitano di un'attenta interpretazione che non prescindano da altri indicatori relativi allo stesso paziente. Il test, infatti, non può essere utilizzato da solo per una diagnosi clinica ed il risultato del test deve essere valutato insieme a dati provenienti dall'anamnesi del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

## 12. RANGE DI CALIBRAZIONE

Range di calibrazione 3.0-100.0 AU/ml.

Per campioni > 100.0 AU/ml ripetere il test prediluendo il campione in Negative Control/Sample Diluent (PF83607- non fornito con il kit).

## 13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 5 campioni (2 Negativi, 1 a Cut-Off e 2 Positivi) ai quali sono stati aggiunti i seguenti interferenti:

Fattore Reumatoide (44-220 IU/ml)

Bilirubina (4.5-45 mg/dl)

Trigliceridi (10-250 mg/dl)

Emoglobina (5-30 mg/ml)

La presenza nel siero in esame di sostanze interferenti sopra riportate non altera il risultato del test.

## 14. CROSS-REATTIVI

6 campioni, positivi a β-2-Glycoprotein, Cardiolipin, Gliadin, LKM-1, ASCA, AMA-M2 sono stati testati.

Non sono state rilevate reazioni crociate significative.

## 15. STUDI DI COMPARAZIONE

In una sperimentazione sono stati analizzati 74 campioni con un kit Diesse ed un altro kit del commercio

Di seguito sono schematizzati i dati della sperimentazione:

Riferimento		
+	-	Totale

<b>Diesse</b>	<b>+</b>	11	1	12
	<b>-</b>	0	62	62
	<b>Totale</b>	11	63	74

Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica):

100.0% CI<sub>95%</sub>: 74.1-99.7

Percent Negative Agreement (~Specificità Diagnostica):

98.4% CI<sub>95%</sub>: 91.5-99.7

Il grado di concordanza tra i due metodi risulta essere ottimo con un valore di K (Costante di Cohen) di 0.96.

## 16. PRECISIONE E RIPETIBILITA'

Campione	All'interno della seduta		Tra sedute	
	Media AU/ml	CV%	Media AU/ml	CV%
1	56.3	9.3	55.2	9.8
2	46.6	10.8	50.1	9.3
3	< 3.0	-	< 3.0	-
4	< 3.0	-	< 3.0	-
5	< 3.0	-	< 3.0	-

Campione	Tra lotti	
	Media AU/ml	CV%
1	56.3	9.3
2	46.6	10.8
3	< 3.0	-
4	< 3.0	-
5	< 3.0	-

## 17. BIBLIOGRAFIA

1. Goodpasture, E. W.: The significance of certain pulmonary lesions to the etiology of influenza. Am J Med Sci 158 (1919), 864 – 870
2. Lerner, R. A., et al.: The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. J Exp Med 126 (1967), 989 – 1004



**DIESE Diagnostica Senese S.p.A.**  
Via delle Rose 10  
53035 Monteriggioni (Siena)  
Italy





## INSTRUCTIONS FOR USE

### CHORUS GBM

#### **For the semiquantitative determination of IgG antibodies anti-Glomerular Basement Membrane protein (GBM)**

#### **For *In Vitro* Diagnostic Use Only**

##### **1. INTENDED USE**

**Immunoenzymatic method for the semiquantitative determination of IgG class antibodies against Glomerular Basement Membrane protein (GBM) in human serum, using a disposable device applied on the chorus and Chorus TRIO instruments.**

##### **2. INTRODUCTION**

Goodpasture syndrome is an autoimmune disorder of the kidneys, named after Ernest Goodpasture, who was the first to describe the coexistence of a fatal lung hemorrhage coming along with proliferative glomerulonephritis. Nowadays, this syndrome is considered to be an autoimmune disorder consisting of a triad of glomerulonephritis, lung hemorrhage and anti-glomerular basement antibodies formation. Incidence of the Goodpasture syndrome ranges about 0.5 to 1 cases per million inhabitants per year. Goodpasture syndrome is of high medical emergency with a case fatality rate of 75 to 90 %, due to kidney and respiratory insufficiency, if not treated. The disorder is characterized histologically by continuous linear deposition of immunoglobulins along the glomerular basement membrane (GBM). Demonstration by direct immunofluorescence on kidney biopsies is possible. Today, the determination of circulating autoantibodies against the C-terminus of the  $\alpha$ -3 chain of type VI collagen is the state-of-the art serology.

Glomerular basement membranes (GBM) are an anatomical barrier wherever epithelia meets connective tissue. Type VI collagen is exclusive to GBM and forms a matrix in which additional molecules (e.g. Laminin, Entactin) are integrated. Three out of six  $\alpha$ -chains (polypeptides with more than 1650 amino acids) are forming a triple helix and characterize the structural subunits of type IV collagen.

Goodpasture specific anti-GBM autoantibodies are directed against the 29 kDa NC1 domain of the  $\alpha$ -3 chain of type VI collagen of GBM. Following the characterization of the antigen, diagnosis is established today by demonstrating the triad of glomerulonephritis, lung hemorrhage and antibodies against the  $\alpha$ -3 chain of type VI collagen of GBM.

##### **3. PRINCIPLE OF THE METHOD**

The Chorus GBM device is ready to use for the detection of IgG antibodies against Glomerular Basement Membrane protein (GBM), in the Chorus/ Chorus TRIO instruments.

The test is based on the ELISA principle (Enzyme linked Immunosorbent Assay). The antigen is bound to the solid phase. The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with diluted human serum. After washing to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of anti-human immunoglobulins antibodies conjugated to horse radish peroxidase.

The unbound conjugate is eliminated and the peroxidase substrate is added. The colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample.

The disposable devices contain all the reagents to perform the test in the Chorus/Chorus TRIO instruments.

The results are expressed in Arbitrary Units (AU/ml).

##### **4. WARNINGS AND PRECAUTIONS**

###### **FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE ONLY**

**This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HBsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling reagents and samples.**

**Waste disposal: serum samples, calibrators and strips, once used, must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.**

###### **Health and Safety Information**

1. Do not pipette by mouth.
2. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens.
3. Wash hands thoroughly after placing the devices in the Chorus/Chorus TRIO instrument.
4. Consult the relative Material Safety Data Sheet (available on request) for all the information on safety concerning the reagents contained in the kit.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium

hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

### Analytical Precautions

Bring the devices to room temperature (18-30°C) before use; use within 60 min.

1. **Discard devices which show the substrate (well 4) blue colored.**
2. Adding the sample into the well verify that it is perfectly distributed on the bottom.
3. Check for the presence of the reagents in the device and that the device is not damaged. Do not use devices which are lacking a reagent and/or present foreign bodies in the reaction well when visually inspected.
4. The devices are for use with the Chorus/Chorus TRIO instrument; the Instructions for Use and the Instrument Operating Manual must be carefully followed.
5. Check that the Chorus/Chorus TRIO instrument is set up correctly (see Operating Manual).
6. Do not alter the bar code placed on the handle of the device in order to allow correct reading by the instrument.
7. Avoid using self-defrosting freezers for the storage of the samples.
8. Defective barcodes can be inserted manually in the instrument (see Operating Manual).
9. Do not expose the devices to strong light or to hypochlorite vapors during storage and use.
10. The use of strongly hemolyzed, lipemic, icteric samples, of serum not completely coagulated or of samples presenting microbial contamination may all constitute sources of error.
11. Do not use the device after the expiry date.
12. **Make sure that the instrument is connected to the Washing Buffer Autoimmunity (Ref. 86004).**

### 5. KIT COMPOSITION AND REAGENT PREPARATION

The kit is sufficient for 36 tests (REF 86070).

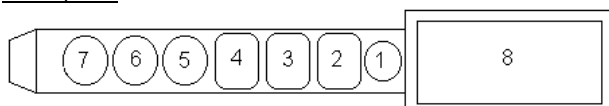
The kit is sufficient for 12 tests (REF 86070/12).

### DD DEVICES

6 packages each containing 6 devices (REF 86070).

2 packages each containing 6 devices (REF 86070/12).

Description:



**Position 8:** Space for application of bar code label

**Position 7:** Empty

**Position 6:** MICROPLATE WELL

coated with Glomerular Basement Membrane protein

**Position 5:** Uncoated MICROPLATE WELL

**Position 4:** TMB SUBSTRATE

Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01% stabilized in 0.05 mol/L citrate buffer (pH 3.8)

**Position 3:** SAMPLE DILUENT

Contents: saline proteic solution with Proclin (0.1%)

**Position 2:** CONJUGATE

Contents: anti-human IgG monoclonal antibodies labeled with horse radish peroxidase, in phosphate buffer containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

**Position 1:** EMPTY WELL

in which undiluted serum must be added

**Use:** equilibrate a package at room temperature, open the package and remove the required devices; replace the others in the bag with the silica gel, expel the air and **seal** by pressing the closure. Store at 2-8°C.

**CALIBRATOR** CALIBRATOR 1 x 0.175 ml

Contents: Diluted human serum containing IgG antibodies anti-Glomerular Basement Membrane protein (GBM) and preservative. Liquid, ready for use.

**CONTROL +** POSITIVE CONTROL 1 x 0.425 ml

Contents: Diluted human serum containing IgG antibodies anti-Glomerular Basement Membrane protein (GBM) and preservative. Liquid, ready for use.

### MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- WASHING BUFFER AUTOIMMUNITY (REF 86004)
- CLEANING SOLUTION 2000 (REF 83609)
- SANITIZING SOLUTION (REF 83604 - 83608)
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT (REF 83607)
- Chorus/Chorus TRIO Instrument
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 50-200 µl solution
- Disposable gloves
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials

### 6. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C. In the case of storage at an incorrect temperature the calibration must be repeated and the run validated using the control serum (see section 9, Test validation).

The expiry date is printed on each component and on the kit label.

Reagents have a limited stability after opening:

DEVICES	8 weeks at 2/8°C
CALIBRATOR	8 weeks at 2/8°C

POSITIVE CONTROL 8 weeks at 2/8°C

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice.

Possible consequences, in case of use of other biological liquids, are not known.

The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times.

Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be shaken carefully before use.

Heat-inactivation can rise to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

## 8. ASSAY PROCEDURE

1. Open the package (on the side containing the pressure-closure), remove the number of devices required and seal the rest in the bag after expelling the air.
2. Check the state of the device according to the indications reported in chapter 4, Analytical Precautions.
3. Dispense 50 µl of undiluted test serum in well no. 1 of each device; at each change of batch, use a device for the calibrator.
4. Place the devices in the Chorus/Chorus TRIO instrument. Perform the calibration (if necessary) and the test as reported in the instrument Operating Manual.

## 9. TEST VALIDATION

Use the control serum to check the validity of the results obtained. It should be used as reported in the instrument Operating Manual. If the instrument signals that the control serum has a value outside the acceptable range, the calibration must be repeated. The previous results will be automatically corrected.

If the result of the control serum continues to be outside the acceptable range, contact the Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554  
 Fax: 0039 0577 366605  
 email: scientificsupport@diesse.it

## 10. INTERPRETATION OF THE RESULTS

The Chorus/Chorus TRIO instrument expresses the result in Arbitrary Units (AU/ml) calculated on the basis of a lot-dependent graph stored in the instrument.

The test on the examined serum can be interpreted as follows:

POSITIVE: when the result is > 18.0

NEGATIVE: when the result is < 12.0

DOUBTFUL/EQUIVOCAL: for all values between 12.0 and 18.0

If the result is doubtful/equivocal, repeat the test. If it remains doubtful/equivocal, collect a new serum sample.

## 11. LIMITATIONS

All the values obtained require a careful interpretation that must consider other indicators relative to the patient.

The test, indeed, can not be used alone for a clinical diagnosis and the test result should be evaluated together with the patient history and other clinical diagnostic evaluation.

## 12. CALIBRATION RANGE

Calibration range 3.0 – 100.0 AU/ml.

For samples > 100.0 AU/ml retest the diluted sample in the Negative Control/Sample Diluent (PF83607-not supplied with the kit).

## 13. ANALITICAL SPECIFICITY

5 samples (2 Negative, 1 Cut-Off and 2 Positive) were spiked with the following potentially interfering factors and then tested:

Rheumatoid factor (44-220 IU/ml)

Bilirubin (4.5-45 mg/dl)

Triglycerides (10-250 mg/dl)

Hemoglobin (5-30 mg/ml)

The presence in the serum sample of the interfering substances described above does not affect the test result.

## 14. CROSS-REACTIONS

6 samples, positive to β-2-Glycoprotein, Cardiolipin, Gliadin, LKM-1, ASCA, AMA-M2 were tested.

No significant cross-reactions were found.

## 15. METHOD COMPARISON

In an experimentation 74 samples have been tested with Diesse kit and with a competitor kit .

Data are summarized in the following table :

		Reference		
		+	-	Tot.
Diesse	+	11	1	12
	-	0	62	62
	Tot.	11	63	74

Percent Positive Agreement (~Diagnostic Sensitivity):

100.0% CI<sub>95%</sub>: 74.1-99.7

Percent Negative Agreement: (~Diagnostic Specificity):

98.4% CI<sub>95%</sub>: 91.5-99.7

The agreement between the two methods is excellent with a Cohen's Kappa of 0.96.

## 16. PRECISION AND REPEATABILITY

Sample	Within run		Between run	
	Mean AU/ml	CV%	Mean AU/ml	CV%
1	56.3	9.3	55.2	9.8
2	46.6	10.8	50.1	9.3
3	< 3.0	-	< 3.0	-
4	< 3.0	-	< 3.0	-
5	< 3.0	-	< 3.0	-



Sample	Between lots	
	Mean AU/ml	CV%
1	40.6	14.1
2	24.9	11.9
3	< 3.0	-
4	< 3.0	-
5	< 3.0	-

### 17. REFERENCES

1. Goodpasture, E. W.: The significance of certain pulmonary lesions to the etiology of influenza. Am J Med Sci 158 (1919), 864 – 870
2. Lerner, R. A., et al.: The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. J Exp Med 126 (1967), 989 – 1004



**DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.**  
Via delle Rose 10  
53035 Monteriggioni (Siena)  
Italy





## INSTRUCCIONES DE USO

### CHORUS GBM

#### **Para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgG anti-proteína de la Membrana Basal Glomerular (GBM)**

#### **Sólo para el uso diagnóstico *in vitro***

##### **1. INDICACIONES**

**Método inmunoenzimático para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgG anti-proteína de la Membrana Basal Glomerular (GBM) en suero humano con dispositivo desechable aplicado a los equipos Chorus y Chorus TRIO.**

##### **2. INTRODUCCIÓN**

El síndrome de Goodpasture es una dolencia renal autoinmune, llamado así por Ernest Goodpasture, que fue el primero en describir la coexistencia de una hemorragia pulmonar fatal con glomerulonefritis proliferativa.

Hoy en día este síndrome se considera una dolencia autoinmune que consiste de una tríada de glomerulonefritis, hemorragia pulmonar y la formación de anticuerpos anti-membrana basal glomerular.

La incidencia del síndrome de Goodpasture está sobre 0.5 a 1 casos por millón de habitantes y por año. El síndrome de Goodpasture es de elevada emergencia médica con un ratio de casos fatales, si no se da tratamiento, del 75 al 90%, debido a insuficiencia renal y respiratoria. La dolencia se caracteriza histológicamente por una deposición lineal continua de inmunoglobulinas a lo largo de la membrana basal glomerular (GBM). Es posible la demostración por inmunofluorescencia directa en biopsias de riñón.

Actualmente, la determinación de autoanticuerpos circulantes contra el C-terminal de la cadena  $\alpha$ -3 del colágeno tipo IV es la serología de vanguardia.

Las membranas basales glomerulares (GBM) son una barrera anatómica en donde el epitelio se encuentra con el tejido conectivo. El colágeno del tipo IV es exclusivo de la GBM y forma una matriz en la cual se integran moléculas adicionales (p.e. Laminina, Entactina). Tres de cada seis cadenas- $\alpha$  (polipéptidos con más de 1650 aminoácidos) forman una triple hélice y caracterizan las subunidades estructurales del colágeno tipo IV.

Los autoanticuerpos anti-GBM específicos de Goodpasture se dirigen contra el dominio NC1 de 29 kDa de la cadena  $\alpha$ -3 del colágeno tipo IV de la GBM. Después de la caracterización del antígeno, el diagnóstico hoy se establece

demonstrando la tríada de glomerulonefritis, hemorragia pulmonar y anticuerpos contra la cadena  $\alpha$ -3 del colágeno tipo IV de la GBM.

##### **3. PRINCIPIO DEL MÉTODO**

El dispositivo Chorus GBM está listo para su uso para la detección de anticuerpos IgG anti-proteína de la Membrana Basal Glomerular (GBM), en los equipos Chorus /Chorus TRIO. El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El antígeno está unido a la fase sólida. Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.

Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no hayan reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas conjugadas con peroxidasa de rábano.

El conjugado que no se ha unido se elimina y se añade el sustrato cromogénico de la peroxidasa. El color que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

Los dispositivos desechables contienen todos los reactivos para realizar la prueba cuando se utilizan con los equipos Chorus/Chorus TRIO.

El resultado se expresa en Unidades Arbitrarias (AU/ml).

##### **4. PRECAUCIONES**

#### **PARA USO EXCLUSIVO EN DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.**

**Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y han dado resultados negativos en métodos aprobados por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una garantía completa sobre la ausencia de agentes infecciosos, cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las normas comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.**

**Desecho de los residuos: las muestras de suero, los calibradores y las tiras utilizadas se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, de acuerdo con las disposiciones normativas vigentes.**

#### **Advertencias para la seguridad personal**

1. No pipetear por vía oral.
2. Usar guantes desechables y protección para los ojos al manipular las muestras.
3. Lavarse bien las manos una vez introducidos los dispositivos en el instrumento Chorus/Chorus TRIO.
4. Sobre las características de seguridad de los reactivos contenidos en el kit, consultar la Ficha de Seguridad (disponible bajo solicitud).
5. Los ácidos neutralizados y otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1.0%. Se requiere una

exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.

- El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada debe ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1%, antes de continuar con el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que se limpie la zona. Todos los materiales utilizados para limpiar vertidos, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

#### **Precauciones analíticas**

Poner los dispositivos a utilizar a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso; utilizar en 60 minutos.

- Desechar los dispositivos con sustrato (pocillo 4) de color azul.**
- Añadiendo la muestra al pocillo, comprobar que esté bien distribuida en el fondo.
- Comprobar la presencia de los reactivos en el dispositivo y que éste no esté dañado. No utilizar dispositivos que, en el control visual, presenten falta de algún reactivo y/o cuerpos extraños en el pocillo de reacción.
- Los dispositivos se deben utilizar junto con el equipo Chorus/Chorus TRIO, siguiendo rigurosamente las Instrucciones de Uso y el Manual del Usuario del equipo.
- Comprobar que las opciones del equipo Chorus/Chorus TRIO sean correctas (ver Manual del Usuario).
- No modificar el código de barras colocado en el asa del dispositivo a fin de garantizar la lectura correcta.
- Evitar el uso de congeladores autodescongelantes para la conservación de las muestras.
- Los códigos de barras dañados se pueden colocar en el equipo manualmente (ver Manual del Usuario).
- No exponer los dispositivos a luz intensa ni a humos de hipoclorito durante su conservación y/o uso.
- El uso de muestras altamente hemolizadas, lipémicas, ictericas, de suero no coagulado completamente o de muestras que presenten contaminación microbiana puede ser fuente de error.
- No utilizar el dispositivo después de la fecha de caducidad.
- Comprobar que el aparato esté conectado con la Washing Buffer Autoimmunity (Ref. 86004).**

#### **5. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO**

Reactivos suficientes para 36 determinaciones (REF 86070).

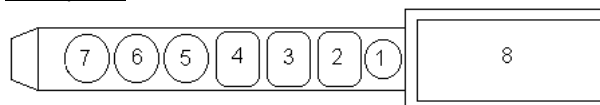
Reactivos suficientes para 12 determinaciones (REF 86070/12).

#### **DD DISPOSITIVOS**

6 envases con 6 dispositivos cada uno (REF 86070).

2 envases con 6 dispositivos cada uno (REF 86070/12).

#### **Descripción:**



**Posición 8:** Espacio para etiquetas con código de barras

**Posición 7:** libre

**Posición 6:** POCILLO DE MICROPLACA

Sensibilizado con proteína de la Membrana Basal Glomerular

**Posición 5:** POCILLO DE MICROPLACA

No sensibilizado.

**Posición 4:** SUSTRATO TMB

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)

**Posición 3:** DILUYENTE PARA MUESTRAS

Contenido: solución proteica salina con Proclin (0.1%)

**Posición 2:** CONJUGADO

Contenido: anticuerpos monoclonales anti-IgG humanos marcados con peroxidasa, en una solución tampón fosfato con fenol al 0.05% y Bronidox al 0.02%.

**Posición 1:** POCILLO LIBRE

Donde el usuario dispensa el suero sin diluir.

**Uso: equilibrar un envase a temperatura ambiente**, abrir el envase y retirar los dispositivos necesarios; colocar los dispositivos no utilizados en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y **cerrar** presionando el cierre. Conservar a 2/8°C.

**CALIBRATOR** CALIBRADOR 1 x 0.175 ml

Contenido: Suero humano diluido que contiene anticuerpos IgG anti-proteína de la Membrana Basal Glomerular (GBM) y conservante. Líquido, listo para su uso.

**CONTROL +** CONTROL POSITIVO 1 x 0.425 ml

Contenido: Suero humano diluido que contiene anticuerpos IgG anti-proteína de la Membrana Basal Glomerular (GBM) y conservante. Líquido, listo para su uso.

#### **MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS:**

- WASHING BUFFER AUTOIMMUNITY (REF 86004)
- CLEANING SOLUTION 2000 (REF 83609)
- SANITIZING SOLUTION (REF 83604 – 83608)
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT (REF 83607)
- Equipo Chorus/Chorus TRIO
- Agua destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 50-200 µl
- Guantes desechables
- Solución de hipoclorito de sodio (5%)
- Envases para la recogida de materiales potencialmente infecciosos

## 6. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. En caso de una errónea temperatura de conservación, la calibración debe ser repetida y la validez del resultado debe ser verificada por medio del suero de control (ver capítulo 9, “Validación de la prueba”).

La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja.

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la apertura y/o preparación.

DISPOSITIVOS	8 semanas a 2/8°C
CALIBRADOR	8 semanas a 2/8°C
CONTROL POSITIVO	8 semanas a 2/8°C

## 7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

La muestra consta de suero extraído de la vena de forma común y debe manipularse siguiendo las precauciones dictadas por la buena práctica de laboratorio.

No se conocen las consecuencias del uso de otros líquidos biológicos.

El suero fresco se puede conservar a 2/8°C durante 4 días; para conservaciones más largas congelar a -20°C.

La muestra se puede descongelar hasta un máximo de 3 veces.

No deben ser utilizados congeladores autodescongelantes para la conservación de la muestra. Después de descongelar, agitar con cuidado antes de su uso.

La inactivación por calor puede dar resultados erróneos.

La calidad de la muestra puede verse seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.

## 8. PROCEDIMIENTO

1. Abrir el envase (por el lado del cierre a presión), retirar los dispositivos necesarios para ejecutar las pruebas y conservar los demás en el envase, extraer el aire y cerrar presionando el cierre.
2. Comprobar visualmente el estado del dispositivo según las indicaciones del capítulo 4, “Precauciones”.
3. Dispensar 50 µl de suero no diluido en el pocillo n°1 de cada dispositivo. Por cada cambio de lote utilizar un dispositivo para el calibrador.
4. Colocar los dispositivos en el equipo Chorus/Chorus TRIO. Ejecutar la calibración (si fuera necesario) y el test según indicaciones del Manual del Usuario del equipo.

## 9. VALIDACIÓN DE LA PRUEBA

Utilizar el suero de control para verificar la validez del resultado obtenido, procesándolo según indicaciones del Manual del Usuario del equipo. Si el equipo indica que el suero de control tiene un valor fuera de los límites de aceptabilidad, es necesario realizar de nuevo la calibración. Los resultados previos se corregirán automáticamente.

Si el resultado del suero de control continúa estando fuera del rango de aceptabilidad, contactar con Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554  
 Fax: 0039 0577 366605  
 email: scientificsupport@diesse.it

## 10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El equipo Chorus/Chorus TRIO proporciona un resultado en Unidades Arbitrarias (AU/ml), calculado según un gráfico lote-dependiente grabado en el equipo.

La prueba del suero examinado puede ser interpretada de la manera siguiente:

POSITIVO cuando el resultado es > 18.0  
 NEGATIVO cuando el resultado es < 12.0  
 DUDOSO/EQUÍVOCO cuando el resultado está entre 12.0 y 18.0

En caso de un resultado dudoso/equívoco se aconseja repetir la prueba. Si el resultado continúa siendo dudoso/equívoco, tomar una nueva muestra.

## 11. LIMITACIONES

Todos los valores obtenidos precisan una atenta interpretación que no prescindida de otros indicadores relativos al mismo paciente.

Este test, de hecho, no debe ser la única prueba utilizada para el diagnóstico clínico. El resultado de la prueba se debe evaluar junto con los datos clínicos y otros procedimientos de diagnóstico.

## 12. RANGO DE CALIBRACIÓN

Rango de calibración 3.0-100.0 AU/ml.

Para muestras > 100.0 AU/ml repetir la prueba y prediluir la muestra en Negative Control/ Sample Diluent (PF83607 – no suministrado con el kit).

## 13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

5 muestras (2 Negativas, 1 de Cut-Off y 2 Positivas) fueron analizadas a las cuales se añadieron los interferentes siguientes:

Factor reumatoide (44-220 IU/ml)  
 Bilirrubina (4.5-45 mg/dl)  
 Triglicéridos (10-250 mg/dl)  
 Hemoglobina (5-30 mg/ml)

La presencia en el suero de las sustancias interferentes antes mencionadas no afecta el resultado del test.

## 14. REACCIONES CRUZADAS

6 muestras, positivas en β-2-Glycoprotein, Cardiolipin, Gliadin, LKM-1, ASCA, AMA-M2 fueron testadas.  
 No se detectaron reacciones cruzadas significativas.

## 15. ESTUDIOS DE COMPARACIÓN

En una prueba, se analizaron 74 muestras con el kit Diesse y con otro kit comercial.

A continuación se muestran los datos de la prueba:

		Referencia		
		+	-	Total
Diesse	+	11	1	12
	-	0	62	62
	Total	11	63	74

Percent Positive Agreement (~Sensibilidad de Diagnóstico):  
100.0% CI<sub>95%</sub>: 74.1-99.7

Percent Negative Agreement: (~Especificidad de Diagnóstico):  
98.4% CI<sub>95%</sub>: 91.5-99.7

El grado de concordancia entre los dos métodos resulta excelente y, con un valor de K (constante de Cohen) de 0.96.

## 16. PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD

Muestra	INTRA-ENSAYO		ENTRE ENSAYOS	
	Media AU/ml	CV%	Media AU/ml	CV%
1	56.3	9.3	55.2	9.8
2	46.6	10.8	50.1	9.3
3	< 3.0	-	< 3.0	-
4	< 3.0	-	< 3.0	-
5	< 3.0	-	< 3.0	-

Muestra	ENTRE LOTES	
	Media AU/ml	CV%
1	40.6	14.1
2	24.9	11.9
3	< 3.0	-
4	< 3.0	-
5	< 3.0	-

## 17. BIBLIOGRAFÍA

1. Goodpasture, E. W.: The significance of certain pulmonary lesions to the etiology of influenza. Am J Med Sci 158 (1919), 864 – 870
2. Lerner, R. A., et al.: The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. J Exp Med 126 (1967), 989 – 1004



**DIESE Diagnostica Senese S.p.A.**  
Via delle Rose 10  
53035 Monteriggioni (Siena)  
Italy





## INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

### CHORUS GBM

#### **Para a determinação semiquantitativa dos anticorpos IgG anti-proteína de Membrana Basal Glomerular (GBM)**

#### **Somente para uso diagnóstico *in vitro***

##### **1. UTILIZAÇÃO**

**Método imunoenzimático para a determinação semiquantitativa dos anticorpos de classe IgG anti-proteína de Membrana Basal Glomerular (GBM) no soro humano com um dispositivo descartável aplicado nos instrumentos Chorus e Chorus TRIO.**

##### **2. INTRODUÇÃO**

A síndrome de Goodpasture é uma doença autoimune dos rins, assim chamada após os estudos conduzidos por Ernest Goodpasture, o qual foi o primeiro a descrever a coexistência de uma hemorragia pulmonar letal associada a uma glomerulonefrite proliferativa.

Actualmente, essa síndrome é considerada uma doença autoimune constituída pela tríade de glomerulonefrite, hemorragia pulmonar e formação de anticorpos dirigidos contra a membrana glomerular basal. A incidência dessas síndrome varia de aproximadamente 0,5 a 1 caso/milhão de pessoas por ano. Essa representa uma grave emergência médica com uma incidência de falecimentos de 75 a 90%, se não for tratada, devido a insuficiência renal e respiratória. A disfunção é caracterizada histologicamente pela formação linear contínua de imunoglobulinas ao longo da membrana glomerular basal (GBM). Pode ser utilizada a imunofluorescência directa em biopsias renais para evidenciar essa deposição. Actualmente, o método serológico em uso é constituído pela determinação dos auto-anticorpos dirigidos ao terminal-C da cadeia  $\alpha$ -3 do colagénio tipo VI.

As membranas glomerulares basais (GBM) constituem uma barreira anatómica onde o tecido epitelial entra em contacto com o tecido conectivo. O colagénio de tipo VI é exclusivo para o GBM e forma uma matriz na qual são integradas outras moléculas (por ex.: Laminina, Entactina). Das seis cadeias  $\alpha$  (polipéptidos com mais de 1650 aminoácidos), três formam uma espiral tripla e caracterizam as subunidades estruturais do colagénio de tipo IV. Os auto-anticorpos específicos anti-GBM de Goodpasture são dirigidos contra o domínio NC1 de 29 kDa da cadeia  $\alpha$ -3 do colagénio de tipo VI da GBM. Depois da caracterização do

antigénio, actualmente o diagnóstico é estabelecido através da demonstração das três disfunções: glomerulonefrite, hemorragia pulmonar e anticorpos dirigidos à cadeia  $\alpha$ -3 do colagénio de tipo VI da GBM.

##### **3. PRINCÍPIO DO MÉTODO**

O dispositivo Chorus GBM está pronto para ser utilizado na determinação dos anticorpos IgG anti-proteína de Membrana Basal Glomerular (GBM), nos instrumentos Chorus/Chorus TRIO.

O teste baseia-se no princípio ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). O antigénio é ligado à fase sólida. As imunoglobulinas específicas ligam-se ao antigénio por incubação com soro humano diluído. Após as lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, efetua-se a incubação com o conjugado constituído por anticorpos anti-imunoglobulinas humanas conjugadas com peroxidase de rábano.

Elimina-se o conjugado não ligado e adiciona-se o substrato para a peroxidase. A cor que se forma é proporcional à concentração dos anticorpos específicos presentes no soro analisado.

Os dispositivos descartáveis contêm todos os reagentes para executar o teste, quando aplicados aos instrumentos Chorus/Chorus TRIO.

O resultado é expresso em Unidades Arbitrárias (AU/ml).

##### **4. PRECAUÇÕES**

#### **SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.**

**Este kit contém materiais de origem humana com os quais foram testados, de acordo com os testes aprovados pela FDA e os resultados foram negativos para a presença de HBsAg, anticorpos anti-HIV-1, anti HIV-2 e anti-HCV. Visto que nenhum teste de diagnóstico pode oferecer uma garantia completa em relação à ausência de agentes infecciosos, todos os materiais de origem humana devem ser considerados potencialmente infectados. Todos os reagentes e as amostras devem ser manuseados conforme as regras de segurança definidas em cada laboratório.**

**Eliminação de resíduos: as amostras de soro, os calibradores e as tiras usadas devem ser tratadas como resíduos infectados e, portanto, devem ser eliminados de acordo com as disposições de lei em vigor.**

#### **Advertências para a segurança individual**

1. Não pipetar com a boca.
2. Usar luvas descartáveis e uma proteção para os olhos quando manusear as amostras.
3. Lavar muito bem as mãos ao inserir os dispositivos no instrumento Chorus/Chorus TRIO.
4. Em mérito às características de segurança dos reagentes contidos no kit, consultar a Ficha de Segurança (Disponível a pedido).
5. Os ácidos neutralizados e os outros resíduos líquidos devem ser desinfectados adicionando um volume de

hipoclorito de sódio suficiente para obter uma concentração final pelo menos de 1%. A exposição ao hipoclorito de sódio a 1% durante 30 minutos deverá ser suficiente para garantir uma desinfecção eficaz.

- Eventuais derramamentos de materiais potencialmente infecciosos devem ser absorvidos imediatamente com papel absorvente e a área afetada deverá ser descontaminada, por exemplo com hipoclorito de sódio a 1%, antes de continuar o trabalho. Se estiver presente um ácido, o hipoclorito de sódio não pode ser usado antes de enxugar a área. Todos os materiais usados para descontaminar eventuais derramamentos acidentais, incluindo as luvas, devem ser eliminados como lixo potencialmente infectado. Não esterilizar na autoclave materiais que contenham hipoclorito de sódio.

#### **Advertências analíticas**

Antes do uso, deixar que os dispositivos a utilizar se estabilizem em temperatura ambiente (18-30°C) e utilizar no prazo de 60 minutos.

- Deitar fora os dispositivos com substrato (poço 4) azul.**
- Adicionando a amostra ao poço, verificar se está distribuído perfeitamente no fundo.
- Verificar a presença efetiva dos reagentes no dispositivo e a integridade do mesmo. Não usar dispositivos que, ao efetuar a verificação visual, demonstrem a falta de alguns reagentes e/ou apresentem corpos estranhos no poço de reação.
- Os dispositivos devem ser utilizados exclusivamente com o instrumento Chorus/Chorus TRIO, seguindo rigorosamente as Instruções de Utilização e o Manual de Utilização do instrumento.
- Verificar se o instrumento Chorus/Chorus TRIO foi programado corretamente (ver o Manual de Utilização Chorus).
- Não alterar o código de barras no punho do dispositivo, para permitir uma correta leitura por parte do instrumento.
- Evitar o uso de congeladores no frost para a conservação das amostras.
- Códigos de barras com defeitos podem ser inseridos manualmente no instrumento (ver o Manual de Utilização).
- Durante o uso e a conservação, não expor os dispositivos a forte luz ou a vapores de hipoclorito.
- Amostras fortemente hemolisadas, lipêmicas, ictericas, de soro não coagulado completamente ou amostras com contaminação bacteriana podem gerar resultados errados.
- Não usar o dispositivo depois da data de validade.
- Verificar se o instrumento possui a conexão ao Washing Buffer Autoimmunity (REF 86004).**

#### **5. COMPOSIÇÃO DO KIT E PREPARAÇÃO DOS REAGENTES**

O kit é suficiente para 36 determinações (REF 86070).

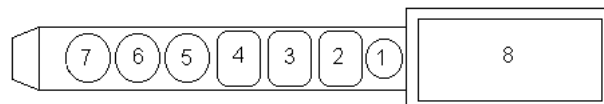
O kit é suficiente para 12 determinações (REF 86070/12).

#### **DD** DISPOSITIVOS

6 embalagens de 6 dispositivos cada (REF 86070).

2 embalagens de 6 dispositivos cada (REF 86070/12).

#### Descrição:



**Posição 8:** Espaço disponível para o rótulo com o código de barras

**Posição 7:** Vazia

**Posição 6:** POÇO DA MICROPLACA

Sensibilizado com proteína de Membrana Basal Glomerular

**Posição 5:** POÇO DA MICROPLACA

Não sensibilizado.

**Posição 4:** SUBSTRATO TMB

Conteúdo: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01% estabilizados em tampão citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)

**Posição 3:** DILUENTE PARA AMOSTRAS

Conteúdo: solução proteica salina com Proclin (0.1%)

**Posição 2:** CONJUGADO

Conteúdo: anticorpos monoclonais anti-IgG humanas marcadas com peroxidase, em solução tampão de fosfato, contendo fenol 0.05% e Bronidox 0.02%

**Posição 1:** POÇO VAZIO

Onde o utilizador deve deitar o soro não diluído.

**Uso:** estabilizar um pacote em temperatura ambiente, abrir o pacote, retirar os dispositivos necessários; colocar os restantes no pacote com o gel de sílica, esvaziar o ar e fechar o pacote premindo o fecho. Conservar entre 2 e 8°C.

#### **CALIBRATOR** CALIBRADOR 1 x 0.175 mL

Conteúdo: Soro humano diluído que contém anticorpos IgG anti-proteína de Membrana Basal Glomerular (GBM) e conservante. Líquido, pronto a usar.

#### **CONTROL +** CONTROLO POSITIVO 1 x 0.425 ml

Conteúdo: Soro humano diluído que contém anticorpos IgG anti-proteína de Membrana Basal Glomerular (GBM) e conservante. Líquido, pronto a usar.

#### **OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS:**

- WASHING BUFFER AUTOIMMUNITY (REF 86004)
- CLEANING SOLUTION 2000 (REF 83609)
- SANITIZING SOLUTION (REF 83604 - 83608)
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT (REF 83607)
- Instrumento Chorus/Chorus TRIO
- Água destilada ou deionizada
- Vidros normais de laboratório: cilindros, provetas, etc.

- Micropipetas com capacidade para recolher com precisão volumes de 50 a 200 µl
- Luvas descartáveis
- Solução de hipoclorito de sódio a 5%
- Recipientes para a recolha de materiais potencialmente infectados

## 6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes devem ser conservados entre 2 e 8°C. Em caso de temperatura de conservação errada, é necessário repetir a calibração e verificar a exatidão do resultado por meio do soro de controlo (consultar o capítulo 9 - Validação do teste).

A data de validade está impressa em cada componente e no rótulo externo da embalagem.

Os reagentes têm uma estabilidade limitada depois da abertura e/ou da preparação:

DISPOSITIVOS	8 semanas entre 2 e 8°C
CALIBRADOR	8 semanas entre 2 e 8°C
CONTROLO POSITIVO	8 semanas entre 2 e 8°C

## 7. TIPO DE AMOSTRAS E CONSERVAÇÃO

O tipo de amostra é representado por soro obtido de sangue recolhido das veias e manuseado de acordo com os procedimentos standard de laboratório.

Não são conhecidas as consequências provocadas pelo uso de outros líquidos biológicos.

O soro fresco pode ser conservado durante 4 dias entre 2 e 8°C; para períodos de conservação mais prolongados, congelar a -20°C.

A amostra pode ser descongelada até um máximo de 3 vezes. Evitar o uso de congeladores no frost para a conservação das amostras. Depois de descongelar, misturar cuidadosamente antes da dosagem.

A inativação ao calor pode levar a resultados errados.

A qualidade das amostras pode ser gravemente influenciada pela contaminação bacteriana, que pode gerar resultados errados.

## 8. PROCEDIMENTO

1. Abrir o pacote (do lado da fechadura por pressão), retirar o número de dispositivos necessários para os testes e conservar os restantes no pacote, esvaziar o ar e fechar o pacote.
2. Verificar visualmente as condições do dispositivo de acordo com as indicações do capítulo 4, "Precauções Analíticas".
3. Distribuir no poço 1 de cada dispositivo 50 µl de soro não diluído a testar; em cada mudança de lote utilizar um dispositivo para o calibrador.
4. Inserir o dispositivo no instrumento Chorus/Chorus TRIO. Efetuar a calibração (se necessário) e o teste como definido no Manual do Instruções do instrumento.

## 9. VALIDAÇÃO DO TESTE

Utilizar o soro de controlo positivo para verificar a exatidão do resultado obtido, testando-o de acordo com as indicações do Manual de Utilização do instrumento. Se o equipamento assinalar que o soro de controlo está fora do limite de aceitação, é necessário efetuar novamente a calibração. Os resultados anteriores serão corrigidos automaticamente. Se o resultado do soro de controlo continuar fora do intervalo de aceitação, contatar il Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554  
 Fax: 0039 0577 366605  
 email: scientificsupport@diesse.it

## 10. INTERPRETAÇÃO DO TESTE

O instrumento Chorus/Chorus TRIO fornece um resultado em Unidades Arbitrárias (AU/ml) calculado em função de um gráfico dependente do lote e memorizado no instrumento.

O teste do soro analisado pode ser interpretado como segue:

POSITIVO quando o resultado for > 18.0  
 NEGATIVO quando o resultado for < 12.0  
 INCERTO/EQUIVOCADO quando o resultado estiver entre 12.0 e 18.0

Repetir o teste em caso de resultado incerto/equivocado. Se o resultado continuar incerto/equivocado, repetir a recolha.

## 11. LIMITAÇÕES DO TESTE

Todos os valores obtidos necessitam de uma interpretação atenta independentemente dos outros indicadores relativos ao mesmo paciente. O teste, de fato, por si só não pode ser utilizado para um diagnóstico clínico definitivo e o resultado do teste deve ser sempre avaliado juntamente com os dados provenientes da anamnese do paciente e/ou com outros procedimentos diagnósticos.

## 12. INTERVALO DE CALIBRAÇÃO

Intervalo de calibração 3.0-100.0 AU/ml.  
 Para amostras > 100.0 AU/ml repetir o teste diluindo primeiramente a amostra com o Negative Control/Sample Diluent (PF83607- não fornecido com o kit).

## 13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 5 amostras (2 Negativos, 1 Cut-Off e 2 Positivos) às quais foram adicionados os seguintes interferentes:

Fator Reumatoide (44-220 UI/ml)  
 Bilirrubina (4.5-45 mg/dl)  
 Triglicéridos (10-250 mg/dl)  
 Hemoglobina (5-30 mg/ml)

A presença, no soro em análise, das substâncias interferentes acima referidas não altera o resultado do teste.



#### 14. REAÇÕES CRUZADAS

Foram testadas 6 amostras, positivas em  $\beta$ -2-Glycoprotein, Cardiolipin, Gliadin, LKM-1, ASCA, AMA-M2.

Não foram detectadas reações cruzadas significativas.

#### 15. ESTUDOS DE COMPARAÇÃO

Numa experimentação, foram analisadas 74 amostras com o kit Diesse e com outro kit do mercado.

Esquematizam-se, de seguida, os dados da experimentação:

		Referência		
		+	-	Total
Diesse	+	11	1	12
	-	0	62	62
	Total	11	63	74

Percent Positive Agreement (~Sensibilidade Diagnóstica):

100.0% CI<sub>95%</sub>: 74.1-99.7

Percent Negative Agreement: (~Especificidade Diagnóstica):

98.4% CI<sub>95%</sub>: 91.5-99.7

O grau de concordância entre os dois métodos demonstra ser ótimo com um valor de K (Constante de Cohen) de 0.96.

#### 16. PRECISÃO E REPETIBILIDADE

Amostra	No Ensaio		Entre Ensaios	
	Média AU/ml	CV%	Média AU/ml	CV%
1	56.3	9.3	55.2	9.8
2	46.6	10.8	50.1	9.3
3	< 3.0	-	< 3.0	-
4	< 3.0	-	< 3.0	-
5	< 3.0	-	< 3.0	-

Amostra	Entre Lotes	
	Média AU/ml	CV%
1	40.6	14.1
2	24.9	11.9
3	< 3.0	-
4	< 3.0	-
5	< 3.0	-








#### 17. BIBLIOGRAFIA

1. Goodpasture, E. W.: The significance of certain pulmonary lesions to the etiology of influenza. Am J Med Sci 158 (1919), 864 – 870
2. Lerner, R. A., et al.: The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. J Exp Med 126 (1967), 989 – 1004



**DIESSSE Diagnostica Senese S.p.A.**  
Via delle Rose 10  
53035 Monteriggioni (Siena)  
Italy



	EN Date of manufacture ES Fecha de fabricación IT Data di fabbricazione	FR Date de fabrication GR Ημερομηνία Παραγωγής PT Data de fabrico
	EN Use By ES Fecha de caducidad IT Utilizzare entro	FR Utiliser jusque GR Ημερομηνία λήξης PT Prazo de validade
	EN Do not reuse ES No reutilizar IT Non riutilizzare	FR Ne pas réutiliser GR Μην κάνετε επαναληπτική χρήση PT Não reutilizar
	EN Caution, consult accompanying documents ES Atención, ver instrucciones de uso IT Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR Attention voir notice d'instructions GR Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα PT Atenção, consulte a documentação incluída
	EN Manufacturer ES Fabricante IT Fabbicante	FR Fabricant GR Κατασκευαστής PT Fabricante
	EN Contains sufficient for <n> tests ES Contenido suficiente para <n> ensayos IT Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR Contenu suffisant pour "n" tests GR Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις PT Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	EN Temperature limitation ES Límite de temperatura IT Limiti di temperatura	FR Limites de température GR Περιορισμοί θερμοκρασίας PT Limites de temperatura
	EN Consult Instructions for Use ES Consulte las instrucciones de uso IT Consultare le istruzioni per l'uso	FR Consulter les instructions d'utilisation GR Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης PT Consulte as instruções de utilização
	EN Biological risks ES Riesgo biológico IT Rischio biologico	FR Risques biologiques GR Βιολογικοί κίνδυνοι PT Risco biológico
	EN Catalogue number ES Número de catálogo IT Numero di catalogo	FR Référence du catalogue GR Αριθμός καταλόγου PT Referência de catálogo
	EN In Vitro Diagnostic Medical Device ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR Dispositif médical de diagnostic in vitro GR In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν PT Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN Batch code ES Código de lote IT Codice del lotto	FR Code du lot GR Αριθμός Παρτίδας PT Código do lote