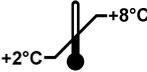


REF 43735 	ZENIT RA GBM		Distribuito da 
ISTRUZIONI PER L'USO		  50	

FINALITA' D'USO

Il test *ZENIT RA GBM* è un test immunologico chemiluminescente (CLIA) per la determinazione quantitativa, con strumentazione dedicata *ZENIT RA Analyser*, degli anticorpi specifici di classe IgG diretti contro la Membrana Basale Glomerulare (Glomerular Basal Membrane o GBM), in campioni di siero o plasma umano (EDTA, Sodio Citrato).

Questo dosaggio viene impiegato come ausilio diagnostico nella valutazione della sindrome di Goodpasture e per la diagnosi differenziale delle vasculiti.

ATTENZIONE: Qualunque decisione medica non può essere basata unicamente sul risultato di questo test, ma va fondata sulla valutazione dell'insieme di tutti i dati clinici e di laboratorio disponibili.

SIGNIFICATO CLINICO

Gli anticorpi anti-membrana basale glomerulare (anti-GBM) sono il *marker* sierologico di una rara malattia autoimmune caratterizzata clinicamente dalla presenza di una glomerulonefrite a rapida progressione e istologicamente da glomerulonefrite necrotizzante extracapillare con immunofluorescenza lineare (glomerulonefrite da anticorpi anti-GBM). Quando è contemporaneamente presente un interessamento polmonare (alveolite emorragica) prende il nome di sindrome di Goodpasture (GP)¹.

Il ruolo patogenetico degli anticorpi è certo, infatti il danno tissutale è mediato dal legame degli anticorpi anti-GBM alla membrana basale glomerulare (e alveolare)².

L'autoantigene bersaglio è stato identificato nel dominio non collagenasico (NC1) sulla catena $\alpha 3$ del collagene di tipo IV presente soltanto nelle membrane basali di rene, polmone, coclea e occhio³.

La sindrome di Goodpasture è una malattia molto severa che, in assenza di un tempestivo ed adeguato trattamento, ha un decorso spesso fulminante⁴. Nonostante i progressi terapeutici la sopravvivenza del paziente e d'organo dipendono ancora strettamente dal grado di insufficienza renale alla presentazione, pertanto la diagnosi precoce è essenziale per la sopravvivenza del paziente e il recupero della funzione renale.

La diagnosi di malattia da anticorpi anti-GBM o di GP è basata sulla dimostrazione, mediante una metodica di immunofluorescenza diretta su biopsia renale, di depositi lineari di immunoglobuline sulla membrana basale glomerulare. Comunque, in molte situazioni la biopsia renale non può essere eseguita o deve essere rimandata, pertanto la diagnosi sierologica assume un ruolo fondamentale. Anti-GBM circolanti possono essere rilevati mediante immunofluorescenza indiretta su rene di primate; il metodo è caratterizzato da elevata

specificità ma sensibilità non adeguata⁵. Sono ora disponibili metodi di determinazione immunometrici, quantitativi e antigene-specifici, basati su metodiche ELISA, fluoroimmunoenzimatiche e in chemiluminescenza che utilizzano la GBM intera solubilizzata, la catena $\alpha 3(IV)$ del collagene e, più recentemente l'antigene di GP in forma ricombinante umana⁶. La sensibilità diagnostica dei *test* antigene-specifici è molto elevata, attestandosi tra il 94,7 e il 100%, mentre la specificità verso i controlli patologici varia tra il 90,9 ed il 100%⁶. Dati molto recenti confermano che, nonostante le ottime *performance* diagnostiche dei metodi, in circa il 5% di pazienti affetti da malattia da anticorpi anti-GBM / sindrome di Goodpasture non sono rilevabili autoanticorpi circolanti⁷.

Per il suo importante significato clinico e per gli elevati valori predittivi la ricerca di anticorpi anti-GBM è indicata nell'inquadramento diagnostico di pazienti con quadri clinici di insufficienza renale di origine sconosciuta con microematuria, in particolar modo nei casi a rapida progressione.

Il titolo degli anticorpi anti-GBM circolanti è di utilità prognostica⁸.

In presenza di una sindrome rene-polmone anticorpi anti-GBM possono essere rilevati in circa un terzo dei pazienti.

Gli anticorpi anti-GBM sono direttamente responsabili del danno d'organo, pertanto il loro monitoraggio è considerato molto utile per guidare il trattamento, in particolare di plasmaferesi. La negatività persistente per anti-GBM è una condizione indispensabile per i pazienti in attesa di trapianto renale, per ridurre al minimo la possibilità che la malattia si possa ripresentare nell'organo trapiantato.

Poiché anche le vasculiti sistemiche ANCA-associate possono esordire con un quadro clinico di GN rapidamente progressiva, è utile eseguire, contemporaneamente alla ricerca di anti-GBM, la ricerca degli ANCA. E' bene ricordare che in una significativa percentuale di pazienti con anti-GBM (10-38%) sono contemporaneamente presenti ANCA, generalmente con specificità per la mieloperossidasi (ANCA-MPO), il cui significato clinico non è chiaro^{6,9,10}. Un quadro di GNRP può talvolta essere secondario a patologie sistemiche del connettivo o infezioni.

Relativamente all'utilità diagnostica del dato di laboratorio è utile ricordare che i valori predittivi positivo e negativo (VPP, VPN) dipendono, oltre che dalla sensibilità e specificità del *test*, dalla prevalenza della malattia nella popolazione indagata. Una richiesta appropriata (elevata probabilità pre-*test*) consente di ottenere un risultato di reale utilità clinica e riduce significativamente la possibilità di risultati falsamente positivi.

PRINCIPIO DEL METODO

Il kit *ZENIT RA GBM* per la determinazione quantitativa delle IgG specifiche anti-membrana basale glomerulare, utilizza un metodo immunologico indiretto a due step basato sul principio della chemiluminescenza.

L'antigene altamente purificato NC1 $\alpha 3(IV)$ è utilizzato per rivestire le particelle magnetiche (fase solida) ed un anticorpo anti-IgG umane è marcato con un derivato dell'estere di acridinio (coniugato).

Durante la prima incubazione gli anticorpi specifici presenti nel campione, nei calibratori o nei controlli si legano alla fase solida.

Durante la seconda incubazione il coniugato reagisce con gli anticorpi anti-GBM sequestrati dalla fase solida.

Dopo ciascuna incubazione il materiale non legato alla fase solida è rimosso mediante aspirazione e susseguente lavaggio.

La quantità di coniugato marcato rimasto legato alla fase solida viene valutata mediante attivazione della reazione di chemiluminescenza e misura del segnale luminoso. Il segnale generato, espresso in unità relative di luce (RLU, Relative Light Unit), è indicativo della concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel campione, nei calibratori e nei controlli.

AUTOMAZIONE

Lo strumento *ZENIT RA Analyser* esegue in automatico tutte le operazioni previste dal protocollo di dosaggio: aggiunta nel contenitore di reazione dei campioni, calibratori, controlli, particelle magnetiche, coniugato e soluzioni di attivazione della chemiluminescenza; separazione magnetica e lavaggio delle particelle; misura della luce emessa.

Il sistema calcola i risultati del dosaggio per i campioni ed i controlli mediante curva di calibrazione memorizzata e stampa un rapporto che include tutte le informazioni relative al dosaggio ed al paziente.

MATERIALI E REAGENTI

Materiali e reagenti forniti

REAG	1	MP	2,5 mL
------	---	----	--------

Particelle magnetiche rivestite con l' antigene altamente purificato NC1 α 3(IV) in Tampone Fosfato contenente proteine stabilizzanti, un tensioattivo, Pro-Clin 300 e sodio azide (< 0,1 %) come conservanti.

REAG	2	CONJ	15 mL
------	---	------	-------

Anticorpo monoclonale di topo anti-IgG umane marcato con un derivato dell'estere di acridinio (coniugato), in Tampone Fosfato contenente proteine stabilizzanti e sodio azide (< 0,1 %) come conservante.

REAG	3	DIL	25 mL
------	---	-----	-------

Soluzione Diluente Campioni: Tampone Fosfato contenente sieralbumina bovina, un tensioattivo, un colorante blu e sodio azide (<0,1%) come conservante.

REAG	4	CAL A	1.6 mL
------	---	-------	--------

Siero umano con bassa concentrazione di anticorpi anti-GBM IgG in Tampone Fosfato contenente sieralbumina bovina, un tensioattivo, un colorante blu inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ come conservanti.

REAG

5

CAL B

1,6 mL

Siero umano con elevata concentrazione di anticorpi anti-GBM IgG in Tampone Fosfato contenente sieroalbumina bovina, un tensioattivo, un colorante blu inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ come conservanti.

Tutti i reagenti sono pronti per l'uso.

I reagenti 1, 2 e 3 sono assemblati in un unico insieme che costituisce la cartuccia reagenti.

Le concentrazioni dei Calibratori sono espresse in UA/mL (Unità Arbitrarie) e tarate contro uno standard di riferimento interno. I valori delle concentrazioni, specifici per lotto di prodotto, sono registrati nel DATA DISK inserito nel kit.

DATA DISK

Mini-DVD contenente le informazioni riguardanti tutti i prodotti della Linea ZENIT RA (Reagenti, Calibratori, Sieri di controllo) aggiornati all'ultimo lotto produttivo con l'esclusione dei prodotti scaduti alla data di compilazione del nuovo DATA DISK.

E' sufficiente conservare il DATA DISK con il numero di lotto più elevato per mantenere aggiornate le informazioni richieste per il corretto funzionamento del sistema.

Materiali e reagenti richiesti ma non forniti nel kit

- ZENIT RA Analyzer Cod. No. 41400
- ZENIT RA Cuvette Cube * Cod. No. 41402
Confezione da 960 cuvette.
- ZENIT RA System Liquid * Cod. No. 41409
1 bottiglia da 5 litri di soluzione pronta all'uso.
- ZENIT RA Wash Solution * Cod. No. 41407
1 bottiglia da 10 litri di soluzione pronta all'uso.
- ZENIT RA Trigger Set * Cod. No. 41403
1 flacone da 250 mL di Trigger A (soluzione di preattivazione)
1 flacone da 250 mL di Trigger B (soluzione di attivazione)
- ZENIT RA D-SORB Solution Cod. No. 41436
Confezione da 2 bottiglie da 1 litro di soluzione pronta per l'uso.
- ZENIT RA Cartridge Checking System * Cod. No. 41401

- ZENIT RA Top Cap Set Cod. No. 41566
300 tappi superiori rossi per la chiusura dei contenitori dei calibratori dopo il primo utilizzo.

(*) Lo strumento ZENIT RA Analyzer e gli accessori identificati dall'asterisco sono fabbricati da Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Belgium e distribuiti da A. Menarini Diagnostics Srl.

Altri Reagenti Raccomandati

ZENIT RA ANCA/GBM CONTROL SET Cod. No. 41449
3 fiale da 1,5 mL di siero umano negativo e 3 fiale da 1,5 mL di siero umano positivo per anticorpi anti-GBM.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti forniti nel kit *ZENIT RA GBM* sono solo per uso diagnostico in vitro e non per uso in vivo in uomini o animali.

Questo prodotto deve essere utilizzato in stretta osservanza alle istruzioni riportate nel presente documento da utilizzatori professionali.

Menarini non può essere ritenuta responsabile di perdite o danni generati da un uso non conforme alle istruzioni fornite.

Precauzioni di sicurezza

Questo prodotto contiene materiale di origine animale e pertanto deve essere manipolato come se contenesse agenti infettanti.

Questo prodotto contiene componenti di origine umana. Tutte le unità di siero o plasma utilizzate per la fabbricazione dei reagenti di questo kit sono state analizzate con metodi FDA approvati e trovate non reattive per la presenza di HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 ed anti-HIV2.

Tuttavia, poiché nessun metodo di analisi è in grado di garantire l'assenza di agenti patogeni, tutto il materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto e manipolato come tale.

In caso di imballaggio danneggiato con fuoriuscita dei reagenti provvedere alla decontaminazione dell'area interessata con una soluzione diluita di Ipoclorito di Sodio dopo essersi protetti con idonei dispositivi di protezione individuale (camice, guanti, occhiali).

Provvedere allo smaltimento del materiale utilizzato per la pulizia e dei rifiuti di imballaggio coinvolti nella fuoriuscita, in base alle norme nazionali per lo smaltimento dei rifiuti potenzialmente infetti.

Alcuni reagenti contengono sodio azide come conservante. Poiché la sodio azide può reagire con piombo, rame e ottone piombato formando azidi esplosive nelle tubature, si raccomanda di non eliminare reagenti o rifiuti negli scarichi ma di seguire le norme nazionali in materia di smaltimento rifiuti potenzialmente pericolosi.

Precauzioni operative

Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle presenti Istruzioni per l'uso e seguire scrupolosamente quanto indicato nel manuale operativo dello strumento.

I reagenti forniti nel kit devono essere utilizzati esclusivamente con il sistema *ZENIT RA Analyzer*.

I componenti della cartuccia reagenti non possono essere rimossi dalla cartuccia e riassemblati.

Non usare il kit oltre la data di scadenza.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti forniti nel kit sono tutti pronti per l'uso.

CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

Conservare i reagenti forniti nel kit a 2-8 °C in posizione verticale ed al buio.

In queste condizioni la cartuccia reagenti ed i calibratori non aperti sono stabili sino alla data di scadenza.

La cartuccia reagenti dopo apertura può essere utilizzata per 60 giorni se conservata in frigorifero a 2-8 °C oppure a bordo macchina.

I calibratori dopo apertura possono essere utilizzati per 60 giorni se conservati in frigorifero a 2-8 °C e se la permanenza a bordo non supera le 6 ore per seduta.

Non congelare i reagenti ed i calibratori.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere eseguito su campioni umani di siero e plasma (EDTA – Sodio Citrato).

Si sconsiglia l'uso di campioni lipemici, emolizzati e torbidi.

Se il dosaggio viene eseguito dopo più di 8 ore dalla raccolta del campione, dopo la separazione del siero dal coagulo o del plasma dai globuli rossi, trasferire il supernatante dalle provette di separazione con gel in delle provette secondarie.

Prima di essere analizzati i campioni possono essere conservati in frigorifero a 2-8 °C per 7 giorni al massimo.

Se il dosaggio viene eseguito dopo più di 7 giorni, conservare i campioni congelati a < - 20 °C.

Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.

PROCEDIMENTO OPERATIVO

Per ottenere prestazioni analitiche affidabili attenersi scrupolosamente alle istruzioni riportate nel manuale operativo dello strumento.

Caricamento dei reagenti

Tutti i reagenti forniti nel kit sono pronti per l'uso.

Prima di inserire la cartuccia reagenti nel sistema, il contenitore delle particelle magnetiche deve essere agitato per rotazione orizzontalmente in modo da favorire la risospensione delle particelle. Eseguire l'operazione evitando la formazione di schiuma.

Posizionare la cartuccia reagenti nell'area reagenti dello strumento utilizzando l'apposita guida e lasciare in agitazione per almeno 60 minuti prima dell'uso.

Il posizionamento della cartuccia reagenti determina contemporaneamente la lettura del codice a barre identificativo. In caso di danneggiamento dell'etichetta della cartuccia o in caso di mancata lettura, i dati identificativi della cartuccia reagenti possono essere inseriti manualmente.

Lo strumento mantiene automaticamente in agitazione continua le particelle magnetiche.

Se la cartuccia reagenti viene rimossa dallo strumento, conservarla verticalmente al buio a 2-8 °C.

Caricamento dei calibratori

I calibratori ZENIT RA sono pronti per l'uso. Lasciare i calibratori a temperatura ambiente per 10 minuti ed agitare delicatamente il contenuto, manualmente o mediante vortex, evitando la formazione di schiuma.

Nel caso i calibratori fossero utilizzati per la prima volta, eliminare il sigillo di garanzia ed il tappo bianco di chiusura prima del loro inserimento sullo strumento.

Nel caso i calibratori fossero già stati utilizzati, il contenitore sarà provvisto del tappo superiore (tappo rosso) senza il sigillo di garanzia. Eliminare il tappo di chiusura rosso prima del loro inserimento sullo strumento.

Inserire nello strumento i calibratori nell'area campioni; per la loro identificazione sullo strumento consultare il manuale d'uso dello strumento. I dati del codice a barre devono essere inseriti manualmente in caso di danneggiamento dell'etichetta o in caso di mancata lettura.

I valori della concentrazione degli anticorpi IgG anti-GBM presente nei calibratori sono registrati nel DATA DISK ed automaticamente trasferiti nell'analizzatore.

Al termine della seduta i contenitori dei calibratori devono essere chiusi con gli appositi tappi superiori (tappi rossi) e trasferiti a 2-8 °C sino al loro successivo impiego.

I calibratori possono essere utilizzati per un massimo di quattro volte.

Caricamento dei controlli

Inserire i controlli nell'area campioni dello strumento. Per la loro identificazione sullo strumento consultare il manuale d'uso dello strumento. Nel caso in cui l'etichetta sia danneggiata o in caso di mancata lettura, i dati del codice a barre possono essere inseriti manualmente. Qualora siano utilizzati i Controlli Zenit RA consultare le relative istruzioni d'uso. I valori della concentrazione degli anticorpi IgG anti-GBM presente nei controlli Zenit RA sono registrati nel DATA DISK ed automaticamente trasferiti nell'analizzatore. Selezionare per ogni controllo i parametri richiesti.

Caricamento dei campioni

Inserire i campioni nello strumento, nell'area campioni; per la loro identificazione sullo strumento consultare il manuale d'uso dello strumento. In caso di mancanza del codice a barre sul campione o in caso di mancata lettura, i dati identificativi del campione possono essere inseriti manualmente.

Selezionare per ogni campione i parametri richiesti.

Calibrazione

Lo strumento *ZENIT RA Analyzer* utilizza una curva di calibrazione memorizzata (master curve), generata dal produttore per ogni lotto di cartuccia reagenti.

I parametri della curva master, unitamente ai valori delle concentrazioni dei calibratori, sono memorizzati nel DATA DISK e trasferiti nel database dello strumento.

I calibratori A e B sono utilizzati per ricalibrare la curva master in funzione sia dello strumento utilizzato che dei reagenti a bordo.

Per eseguire la ricalibrazione analizzare in triplicato i due calibratori A e B ed in singolo i controlli. I valori di concentrazione ottenuti con i controlli permettono di validare la nuova calibrazione.

Una volta che la ricalibrazione della curva master sia stata accettata e memorizzata, tutti i campioni successivi possono essere analizzati senza ulteriore calibrazione, tranne nei seguenti casi:

- quando è caricata a bordo dello strumento una cartuccia reagenti con un nuovo numero di lotto;
- quando i valori dei controlli non rientrano nell'intervallo di accettabilità;
- quando è eseguita la procedura di manutenzione dello strumento;
- quando è scaduta la validità della curva master ricalibrata.

La validità della curva master ricalibrata per il kit *ZENIT RA GBM* è di 21 giorni.

La gestione della ricalibrazione è attuata in automatico dallo strumento.

Dosaggio

Premere il tasto di avvio.

1. Il sistema aspira 80 µL di Diluente Campioni, 40 µL di Particelle Magnetiche, 100 µL di Diluente Campioni e 10 µL di campione o controllo in quest'ordine (per i calibratori il siero positivo è fornito prediluito con il Diluente Campioni ed il volume prelevato è di 110 µL). Le soluzioni e la sospensione aspirate sono dispensate nella cuvetta di reazione.
2. La cuvetta di reazione è incubata nel rotore a 37 °C per 10 minuti.
3. Dopo questa fase di incubazione, le particelle magnetiche sono separate e lavate.
4. Nella cuvetta vengono dispensati 200 µL di coniugato.
5. La cuvetta di reazione è incubata nel rotore a 37 °C per 10 minuti.
6. Dopo questa ultima fase di incubazione, le particelle magnetiche sono separate e lavate e la cuvetta viene trasferita nella camera di lettura.
7. La quantità di coniugato legato alla fase solida, espressa in RLU, è direttamente proporzionale alla concentrazione di IgG anti-GBM presente nel campione.
8. Le risposte ottenute sono interpolate sulla curva di taratura e trasformate in concentrazioni.

Campioni con valori di concentrazione più elevati del limite superiore dell'intervallo di misurabilità possono essere diluiti e ritestati. Il nuovo valore ottenuto viene moltiplicato, per ottenere il risultato finale, per il fattore di diluizione utilizzato.

CONTROLLO QUALITA'

Per assicurare la validità del dosaggio, sieri di controllo a differenti livelli di concentrazione (almeno un siero negativo ed un siero positivo) devono essere misurati ogni giorno in cui si esegue il dosaggio.

Se il proprio laboratorio richiede, per la verifica dei risultati del dosaggio, un uso più frequente o un numero più elevato di controlli, seguire le procedure del controllo qualità ivi stabilite.

Se vengono utilizzati i sieri di controllo ZENIT RA, i valori medi attesi ed i limiti di accettabilità sono quelli riportati nel DATA DISK presente anche nella confezione dei controlli.

Qualora venissero utilizzati sieri di controllo diversi, è necessario, prima del loro impiego, definire i valori attesi con reagenti e sistema ZENIT RA.

Qualora il valore dei controlli non rientri nel range di accettabilità specificato, i relativi risultati del dosaggio non sono validi ed i rispettivi campioni devono essere rianalizzati.

In questo caso è necessario eseguire una procedura di ricalibrazione prima della ripetizione del dosaggio.

CALCOLO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolo dei risultati

La concentrazione degli anticorpi IgG anti-GBM presente nei campioni in esame è calcolata automaticamente dal sistema. I valori possono essere visualizzati mediante lettura sul video o attraverso stampa.

Le concentrazioni sono espresse in UA/mL.

Il calcolo della concentrazione di analita nel campione avviene attraverso lettura della risposta ottenuta per ogni campione su una curva di calibrazione elaborata mediante un sistema di "fitting" logistico a quattro parametri (4PL, Y ponderato), corretta periodicamente in funzione delle risposte ottenute nel dosaggio dei calibratori.

Per informazioni dettagliate su come il sistema calcola i risultati, consultare il manuale operativo del sistema.

Interpretazione dei risultati

Il range di misurabilità del dosaggio ZENIT RA GBM è: 0,0 – 1000 UA/mL.

I valori inferiori a 0,0 UA/mL sono valori estrapolati, compare il messaggio "OMR-" e/o ORA e sono riportati con valore "uguale a 0,0 UA/mL".

I valori superiori a 1000 UA/mL hanno il messaggio "OMR+" e/o ORA e possono essere ritestati dopo opportuna diluizione.

I risultati dei campioni possono essere interpretati nel seguente modo:

(UA/mL)	Interpretazione
<40	Il campione è da considerare negativo per la presenza di IgG anti-GBM
≥ 40	Il campione è da considerare positivo per la presenza di IgG anti-GBM

I valori sopra riportati sono da considerare solo valori suggeriti. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri intervalli di riferimento.

LIMITI DEL DOSAGGIO

Per scopi diagnostici, i risultati ottenuti con il kit *ZENIT RA GBM* ed il sistema *ZENIT RA Analyzer* devono essere utilizzati unitamente agli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.

La contaminazione batterica dei campioni e l'inattivazione al calore possono influenzare il risultato del dosaggio.

Gli anticorpi eterofili presenti nei campioni di siero umano possono reagire con i reagenti a base di immunoglobuline, causando interferenze nei dosaggi immunologici in vitro. Questi campioni possono dar luogo a valori anomali se analizzati con il kit *ZENIT RA GBM*.

Campioni di pazienti affetti da epatopatie croniche, infezioni croniche, collagenopatie e mieloma con ipergammaglobulinemia (concentrazione di IgG maggiore di 1800 mg/dL), in alcuni casi, possono presentare valori positivi di IgG anti-GBM.

VALORI ATTESI

Sono stati analizzati i campioni di 100 pazienti sani per verificare la presenza di anticorpi IgG anti-GBM.

Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi, con un valore medio di 1,1 UA/mL ed una deviazione standard di 3,2 UA/mL.

Con i risultati ottenuti è stato calcolato il "Limit of Blank" (LoB = il più alto valore che possiamo attenderci in una serie di campioni che non contengono l'analita). Il "Limit of Blank", determinato come 95° percentile della popolazione negativa, è risultato pari a 6,3 UA/mL con il Lotto di reagenti n. 2.

SENSIBILITA' E SPECIFICITA' CLINICA

Sono stati testati con il kit *ZENIT RA GBM* un totale di 156 campioni di cui 30 campioni di pazienti affetti da sindrome di Goodpasture (GP), 2 campioni di pazienti affetti da glomerulonefrite a rapida progressione (GNRP), 95 campioni affetti da differenti patologie (18 connettiviti sistemiche, 12 vasculiti ANCA-associate, 15 artrite reumatoide, 4 celiachia, 38 patologie infettive, 8 patologie varie), 29 campioni di soggetti normali.

Nella popolazione presumibilmente negativa (18 connettiviti sistemiche, 12 vasculiti ANCA-associate, 15 artrite reumatoide, 4 celiachia, 38 patologie infettive, 8 patologie varie e 29 campioni di soggetti normali) studiata, nessun campione è risultato positivo.

- **Specificità diagnostica** : 100 % (intervallo di confidenza al 95%: 96,3 – 99,9%); su 124 campioni, 124 sono risultati negativi.

Nella popolazione presumibilmente positiva (30 campioni di pazienti affetti da sindrome di Goodpasture (GP) e 2 campioni di pazienti affetti da glomerulonefrite a rapida progressione (GNRP) studiata, tutti i campioni sono risultati positivi.

- **Sensibilità diagnostica** : 100 % (intervallo di confidenza al 95%: 86,7 – 99,7%); (32/32 campioni).

In base ai risultati della specificità e della sensibilità diagnostica, l'accordo diagnostico è del 100 % (intervallo di confidenza al 95%: 96,7 – 99,9%); (156/156 campioni).

PRESTAZIONI

Avvertenza: i dati presentati non rappresentano le specifiche di funzionamento del kit, ma costituiscono evidenza sperimentale di come il kit funzioni entro tali specifiche nel modo previsto dal produttore.

Precisione e Riproducibilità

La **precisione** è stata calcolata analizzando i risultati di 20 replicati di quattro sieri (uno negativo e tre positivi con diverse concentrazioni di IgG anti-GBM) eseguiti con due diversi lotti di reagenti nella stessa seduta sperimentale.

La concentrazione del siero anti-GBM IgG-negativo (N4) è risultata compresa nell'intervallo da 0,0 a 0,4 UA/mL con il Lotto di reagenti n. 2 e 0,0 UA/mL con il Lotto di reagenti n. 3.

In Tabella si riportano i risultati ottenuti con i 3 sieri positivi.

Campione	Reagenti Lot. no.	Concentrazione media (UA/mL)	SD (UA/mL)	CV %
P1	2	81,4	2,52	3,1
	3	64,7	2,07	3,2
P2	2	243,5	18,82	7,7
	3	270,9	11,88	4,4
P3	2	471,5	13,57	2,9
	3	371,9	12,06	3,2

La **riproducibilità** è stata calcolata analizzando i risultati della determinazione di sei sieri (uno negativo e cinque positivi con diverse concentrazioni di IgG anti GBM) eseguita in singolo, in 14 sedute diverse, con un lotto di reagenti.

La concentrazione del siero anti-GBM IgG-negativo (EBV-N1) è risultata compresa nell'intervallo da 0,5 a 2,2 UA/mL.

In Tabella si riportano i risultati ottenuti con i cinque sieri positivi.

Campione	Concentrazione media (UA/mL)	SD (UA/mL)	CV %
GBM-P1	51,2	4,62	9,0
GBM-P2	205,0	15,06	7,3
GBM-P3	296,3	28,84	9,7
GBM-P4	91,6	7,16	7,8
GBM-P5	222,8	18,68	8,4

Linearità delle Diluizioni

Per valutare la linearità delle diluizioni del kit *ZENIT RA GBM* sono state dosate diluizioni scalari di 3 sieri a concentrazione elevata di IgG anti-GBM, eseguite con il Liquido di sistema.

I risultati di questo studio sono riassunti nella seguente tabella.

Campione	Fattore di diluizione	Concentrazione misurata (UA/mL)	Concentrazione attesa (UA/mL)	Recupero %
1	1	338,0	--	(100)
	2	169,0	169,0	100,0
	4	83,2	84,5	98,5
	8	42,1	42,3	99,5
2	1	353,3	-	(100)
	2	173,0	176,7	97,9
	4	93,0	88,3	105,3
	8	42,7	44,2	96,6
3	1	223,6	-	(100)
	2	124,0	111,8	110,9
	4	67,4	55,9	121,0
	8	33,9	28,0	121,1

Si rende necessario sottolineare che alcuni sieri, quando misurati a diluizioni diverse, possono fornire risultati non lineari all'interno dell'intervallo di misurabilità essendo il risultato dipendente non solo dalla concentrazione ma anche dall'affinità degli anticorpi presenti nel campione.

Sensibilità Analitica

La sensibilità analitica del kit *ZENIT RA GBM*, espressa come **limite di rilevazione** (*Limit of Detection – LoD*: ossia la più piccola quantità di analita che il metodo è in grado di misurare) è stata valutata utilizzando la formula per il calcolo $LoD = LoB + C_{\beta} SD_s$ (dove *LoB* rappresenta il valore del "Limit of Blank", *SD_s* la deviazione standard stimata della distribuzione del campione a bassa concentrazione e *C_β* è derivato dal 95 ° percentile della distribuzione standard gaussiana).

Sono stati utilizzati 5 campioni a bassa concentrazione di analita, determinati in singolo con un Lotto di reagenti in 14 esperimenti diversi.

Il Limite di rilevazione del kit *ZENIT RA GBM* è risultato pari a 13,5 UA/mL.

I valori del limite di rilevazione, unitamente a considerazioni di carattere clinico ed ai risultati di comparazione con metodi di riferimento hanno contribuito alla definizione del valore cut-off.

Specificità Analitica: Interferenze

Le prestazioni del dosaggio non sono influenzate dalla presenza nel campione delle sostanze potenzialmente interferenti elencate nella seguente tabella, sino alla concentrazione sperimentata.

Sostanze Potenzialmente Interferenti	Massima concentrazione sperimentata
Bilirubina libera	20 mg/dL
Bilirubina coniugata	20 mg/dL
Emoglobina	1000 mg/dL
Trigliceridi	3000 mg/dL

L'uso di campioni lipemici, emolizzati o torbidi viene comunque sconsigliato.

Specificità Analitica: Reazioni crociate

Per valutare le potenziali reazioni crociate dell'antigene utilizzato per sensibilizzare le microparticelle, è stato condotto uno studio con 49 campioni, tutti con alti livelli di altri autoanticorpi e negativi per anti-GBM IgG.

I campioni utilizzati erano così suddivisi: CCP e/o FR (15), Gliadina A e/o G e/o tTG-A (4), ANCA positivi (12) e ANA e/o ENA (18).

Lo studio non ha mostrato alcuna significativa reazione crociata dell'antigene in fase solida con gli altri autoanticorpi.

Effetto saturazione ad alte dosi

Alcuni metodi immunologici impiegati per la determinazione di campioni contenenti l'analita a concentrazioni estremamente elevate possono fornire livelli apparenti di analita sottostimati (Effetto hook).

Il metodo utilizzato nel kit *ZENIT RA GBM*, essendo un metodo a due incubazioni, non risente di tale effetto.

Un campione con concentrazione estremamente elevata (al di sopra dell'intervallo di misura) di IgG anti-GBM ha confermato l'assenza di effetto "hook" sino alla concentrazione di 1552 UA/mL.

Sensibilità e Specificità Relative

La presenza di anticorpi IgG anti-GBM è stata determinata utilizzando il kit *ZENIT RA GBM* ed un metodo di dosaggio ELISA disponibile in commercio in 156 campioni: 30 campioni di pazienti affetti da sindrome di Goodpasture (GP), 2 campioni di pazienti affetti da glomerulonefrite a rapida progressione (GNRP), 95 campioni affetti da differenti patologie (18 connettiviti sistemiche, 12 vasculiti ANCA-associate, 15 artrite reumatoide, 4 celiachia, 38 patologie infettive, 8 patologie varie), 29 campioni di soggetti normali.

5 campioni hanno dato luogo a risultati discordanti tra il dosaggio *ZENIT RA* ed il dosaggio ELISA disponibile in commercio.

La **concordanza relativa** è risultata pertanto essere pari al 96,8 % (intervallo di confidenza al 95%: 92,3 – 98,8%); (151/156 campioni).

La **sensibilità relativa** è risultata pari al 90,9 % (intervallo di confidenza al 95%: 74,5 – 97,6%); (30/33 campioni).

La **specificità relativa** è risultata pari al 98,4 % (intervallo di confidenza al 95%: 93,7 – 98,7%); (121/123 campioni).

I tre campioni risultati negativi con il kit *ZENIT RA GBM* e positivi con il kit ELISA appartenevano 1 al gruppo dei campioni con patologie infettive, 1 al gruppo dei campioni con patologie varie ed 1 al gruppo dei campioni di soggetti normali.

I due campioni risultati positivi con il kit ZENIT RA GBM e negativi con il kit ELISA appartenevano entrambi al gruppo dei campioni con sindrome di Goodpasture.

BIBLIOGRAFIA

1. Salama AD, Levy JB, Lightstone, Pusey CD. Goodpasture's disease. *Lancet* 2001; 358: 917-20.
2. Lerner RA, Glassock RJ, Dixon FJ, The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. *J Exp Med* 1967; 126: 989-1004.
3. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 2003; 348: 2543-56.
4. Levy JB, Turner AN, Rees AJ, Pusey CD. Long-term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma-exchange and immunosuppression. *Ann Int Med* 2001; 134: 1033-42.
5. Wilson CB, Dixon FJ. Diagnosis of immunopathologic renal disease. *Kidney Int* 1974; 5: 389-401.
6. Sinico RA, Radice A, Corace C, Sabadini E. Anti-glomerular basement membrane antibodies in the diagnosis of Goodpasture syndrome: a comparison of different assays. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 397-401.
7. Mahler M, Radice A, Sinico RA, Damoiseaux J, Seaman A, Buckmelter K et al. Performance evaluation of a novel chemiluminescence assay for detection of anti-GBM antibodies: an International multicenter study. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27 (1): 243-52.
8. Segelmark M, Hellmark T, Wieslander J. The prognostic significance in Goodpasture's disease of specificity, titre and affinity of anti-glomerular-basement membrane antibodies. *Nephron Clin Pract* 2003; 94: 59-68.
9. Hellmark T, Niles JL, Collins AB, McCluskey RT, Brunmark C. Comparison of anti-GBM antibodies in sera with or without ANCA. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 376-85.
10. Levy JB, Hammad T, Coulthart A, Dougan T, Pusey CD. Clinical feature and outcome of patients with both ANCA and anti-GBM antibodies. *Kidney Int* 2004; 66: 1535-40.

**TECHNOGENETICS S.r.l.**

Via Vanvittelli, 4
20129 – Milano – Italia

Stabilimento: Via della Filanda, 26
26900 – Lodi – Italia

ITALIA**Distribuito da**

A. Menarini Diagnostics Srl
Via Lungo L'Emma 7 – 50012 Bagno a Ripoli - Firenze
Tel. 055 56 80 422 - Fax 055 56 80 905
www.menarindiagnosics.com