

# ANCA-MBG-DOT

**REF** HM 025


## DEFINITION

Le **coffret ANCA-MBG-DOT** constitue une méthode de détection immunoenzymatique rapide et qualitative d'autoanticorps sur support membranaire. Il permet la recherche simultanée :

- des **anticorps anti-cytoplasme de polynucléaires neutrophiles** (anti-neutrophil cytoplasm antibodies: ANCA) dirigés contre la myéloperoxydase (MPO) et la protéinase 3 (PR3).
- des **anticorps anti-membrane basale glomérulaire (MBG)** grâce à l'utilisation d'un antigène purifié à partir du collagène IV.

## VALEUR DIAGNOSTIQUE

### ANCA

Les ANCA forment une famille d'autoanticorps dont la valeur diagnostique et pronostique au cours des différentes vascularites systémiques primitives, qu'elles soient ou non associées à une glomérulonéphrite, est maintenant bien établie.

Ils sont dirigés contre les constituants antigéniques présents dans les granules primaires azurophiles (granules alpha) des polynucléaires neutrophiles et dans les lysosomes de monocytes.

Les ANCA ont tout d'abord été mis en évidence par immunofluorescence indirecte utilisant des polynucléaires neutrophiles humains fixés à l'éthanol. La présence d'ANCA se caractérise par deux principaux aspects de répartition bien distinct : l'une cytoplasmique et l'autre périmucléaire. Ces deux types dénommés c-ANCA et p-ANCA, sont respectivement liés, de façon prédominante à des anticorps dirigés contre la protéinase 3 (PR3) et contre la myéloperoxydase (MPO).

La détection par immunofluorescence des ANCA pose néanmoins des problèmes de diagnostic différentiel dans la mesure où il est possible de rencontrer ces anticorps en association avec d'autres autoanticorps donnant un aspect très voisin. Ceci existe aussi bien dans le Wegener et les vascularites où l'association d'ANCA à d'autres autoanticorps a été décrite (facteur rhumatoïde, anticorps antinucléaire, anti-muscle lisse, anti-thyroïdien, etc.) que dans les collagénoses, les hépatites auto-immunes qui, en plus de leurs autoanticorps spécifiques, peuvent lors de tableaux cliniques particuliers développer des ANCA.

La sensibilité diagnostique des ANCA est particulièrement importante pour la granulomatose de Wegner (anti-PR3), le syndrome de Churg et Strauss, la péri-artérite microscopique et les glomérulonéphrites à croissants (anti-MPO).

Ces maladies représentent une urgence médicale qui implique une stratégie de sécurité en matière d'identification des ANCA basée sur une caractérisation en deux temps :

- \* *par immunofluorescence indirecte où les deux aspects reconnus donnent une première orientation vers un diagnostic.*
- \* *une précision fiable des cibles antigéniques (MPO ou PR3) par des techniques immunologiques spécifiques utilisant des antigènes purifiés.*

### MBG

La recherche d'autoanticorps anti-membrane basale glomérulaire (MBG) constitue une aide importante au diagnostic du syndrome de Goodpasture, qui associe une glomérulonéphrite nécrosante et une pneumopathie marquée par des hémoptysies par hémorragies intra-alvéolaires. Il constitue une maladie auto-immune due à des autoanticorps réagissant avec les constituants de la membrane basale (chaîne alpha 3 du collagène IV).

Cette maladie progresse rapidement et, de façon fatale dans plus de 75% des cas en absence de traitement. Un diagnostic rapide, basé sur la recherche des autoanticorps anti-MBG en tant que marqueurs spécifiques, est donc crucial avant que le rein, et souvent le poumon, ne subissent une destruction importante. De plus, la persistance de ces autoanticorps implique de différer la transplantation rénale.

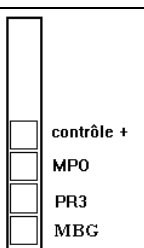
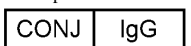


Enfin, la recherche des anticorps anti-MBG permet de différencier le syndrome de Goodpasture des néphropathies associées à la présence d'ANCA qui nécessitent un traitement totalement différent. L'obtention d'un résultat négatif constitue, à ce titre, un élément très important pour le clinicien en terme de diagnostic d'exclusion.

## PRINCIPE DU TEST

Les antigènes sont adsorbés sur un support membranaire constitué de 4 puits distincts.

- Dans un premier temps, la membrane est plongée dans un tube réactionnel contenant l'échantillon à tester. S'il contient un ou plusieurs anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer aux antigènes correspondants. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non fixés.
- Un conjugué, protéine A couplée à la phosphatase alcaline, viendra ensuite se fixer aux autoanticorps précédemment capturés. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer tout excès de conjugué.
- L'étape de chromogénèse est réalisée en utilisant un substrat insoluble de la phosphatase (BCIP/NBT). Au cours de celle-ci apparaissent des cercles de couleur bleue, traduisant la présence d'autoanticorps dans l'échantillon testé.

## COMPOSITION DU COFFRET

|   |  | HM025   |
|---|--|---|
| Bandelettes réactives constituées de 4 puits distincts :                              |  |   |
|   | Antigènes coâtés :<br>- Myéloperoxydase humaine purifiée<br>- Protéinase 3 humaine purifiée<br>- Antigène « Goodpasture » d'origine bovine | 10  |
| Un flacon de Conjugué PAL (protéine A couplée à la phosphatase alcaline)<br>A diluer  |  |  300µl |
| Un flacon de Substrat (BCIP/NBT)<br>Prêt à l'emploi                                   |  |  12 ml |
| Un flacon de Tampon Phosphate-Tween (concentré 10x)<br>A reconstituer en eau distillé |  |  30 ml |
| Tubes de réaction (1,5ml)   |  | 40  |
| Etiquettes autocollantes pour le rendu des résultats                                  |  | 10  |

## ECHANTILLONS

- Le test est à effectuer sur sérum.
- Éviter d'utiliser des sérums lipémiques ou hémolysés, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus d'une fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 5 jours maximum, sinon congelés à -20°C.
- Afin de limiter toutes fixations non spécifiques, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

## MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de précision
- Chronomètre
- Eau distillée (reconstitution du PBS-Tween concentré)
- Papier absorbant (séchage des bandelettes)
- Portoir de 96 tubes de réaction (bmd, réf. HM501)

## PRECAUTIONS D'EMPLOI

S'assurer que les bandelettes soient bien égouttées après chaque lavage.

Les réactifs en solutions (excepté le substrat) contiennent comme agent de conservation, de l'azide de sodium à une concentration <0.1% (w/v) ou du ProClin® 300 à 0.02% (w/v). Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

Le coffret **ANCA-MBG-DOT** a été élaboré dans le respect des Directives européennes 67/548/CEE et 1999/45/CE en ce qui concerne la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses.

**ANCA-MBG-DOT** a été optimisé pour les conditions opératoires précisées dans cette notice. Le non-respect des dilutions, de la préparation des réactifs, du protocole ou la substitution d'un réactif par un autre produit peuvent affecter les performances finales du test.

## STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Les réactifs et les bandelettes doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Après la première ouverture, conserver les bandelettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet déshydratant et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C.
- Remettre immédiatement entre +2°C et +8°C, les réactifs non utilisés.

## PREPARATION DU DOSAGE

Avant la manipulation, ramener tous les réactifs à température ambiante.

### 1. Préparation du Tampon de Dilution et de Lavage (TDL)

- Diluer le PBS-Tween concentré au 1/10 en eau distillée.
- Durée de conservation : 3 mois entre +2°C et +8°C.

### 2. Préparation des échantillons

- Identifier une bandelette par échantillon.
- Identifier 3 tubes de réaction par échantillon. Les numéroter de 1 à 3 :
  - ≠ tube 1 : incubation de l'échantillon
  - ≠ tube 2 : incubation du conjugué
  - ≠ tube 3 : incubation du substrat
- Distribuer 1ml de tampon TDL dans les tubes 1 et 2.
- Préparer un tube supplémentaire réservé aux deux premiers lavages et distribuer 1ml de tampon TDL.

### Remarques :

- ❖ *Le substrat est sensible à la lumière. Il nécessite d'être distribué au moment de son utilisation dans les tubes 3 extemporanément.*
- ❖ *Certaines conditions environnementales comme la température peuvent influencer le résultat final. Pour des températures > +30°C, il est recommandé d'être vigilant sur la cohérence des résultats obtenus.*
- ❖ *Certaines conditions opératoires peuvent influencer l'intensité de la couleur bleue et conduire à une atténuation de celle-ci lorsque :*
  - *le temps d'agitation à chaque lavage est inférieur à 1 minute*
  - *la membrane se colle à la paroi du tube durant les différentes incubations.*
  - *l'homogénéisation, en tampon, de l'échantillon et du conjugué est incomplète.*

## INTERPRETATION DES RESULTATS

### 1. Critères de Validation de la Manipulation :

- Le contrôle positif doit présenter un cercle de couleur bleue avec un contour nettement délimité.

### 2. Lecture des bandelettes :

Pour une interprétation aisée et fiable, vérifier que les bandelettes soient totalement sèches.

Pour chaque spécificité, interpréter selon le tableau ci-dessous :

| ASPECTS DES PUIITS   | RESULTATS                           |
|--|-------------------------------------|
| Aucun puits nettement cerclé   | Absence d'autoanticorps<br>NEGATIF  |
| Présence d'un cercle distinct et bien délimité dont la coloration est nuancée du clair au sombre | Présence d'autoanticorps<br>POSITIF |

*Tous puits présentant un cercle peu discernable, sans contour net, doit être contrôlé sur un second prélèvement quelques semaines plus tard et interprétés en fonction d'examen complémentaires et du contexte clinique.*

## CONTROLE DE QUALITE

bmd propose un contrôle multiparamétrique externe (Immuno-Trol I, réf : HM036) qui peut être testé en parallèle. Il renferme des anticorps humains anti-ANCA (dirigés contre les antigènes MPO et PR3) et anti-MBG. Il est à tester de façon identique à celle des échantillons.

## CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

### 1. SENSIBILITE, SPECIFICITE, CONCORDANCE PAR RAPPORT A UNE AUTRE METHODE

#### • ANCA

Les spécificités MPO et PR3 ont été comparées à une méthode ELISA en microplaques.

L'étude a porté sur 172 échantillons provenant de patients souffrant de pathologies associées à la présence d'ANCA et sur des échantillons provenant d'individus sains ou atteints d'autres maladies auto-immunes.

Tout résultat discordant entre ces deux méthodes a été contrôlé par immunofluorescence indirecte selon le principe exposé dans le § « Valeur diagnostique ».

| Anti-MPO     |          |               |          |
|--------------|----------|---------------|----------|
|              |          | Méthode ELISA |          |
|              |          | Positifs      | Négatifs |
| ANCA-MBG-DOT | Positifs | 32            | 1        |
|              | Négatifs | 0             | 139      |

| Anti-PR3     |          |               |          |
|--------------|----------|---------------|----------|
|              |          | Méthode ELISA |          |
|              |          | Positifs      | Négatifs |
| ANCA-MBG-DOT | Positifs | 20            | 8        |
|              | Négatifs | 2             | 142      |

### Anti-MPO

### Anti-PR3

#### Indices de la valeur diagnostique sur la population sélectionnée

|                                     |                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Sensibilité relative: 100% (32/32)  | Sensibilité relative: 91% (20/22)   |
| Spécificité relative: 99% (139/140) | Spécificité relative: 95% (142/150) |
| Concordance: 99% (171/172)          | Concordance: 94% (162/172)          |

#### Contrôle par immunofluorescence:

- ↳ 1 échantillon positif en DOT et négatif en ELISA. Ce sérum est par ailleurs positif par les deux techniques pour la PR3. Par contre, il donne une fluorescence de type p-ANCA et c-ANCA.
- ↳ 2 échantillons négatifs en DOT et positifs en ELISA, confirmés p-ANCA.
- ↳ 8 échantillons positifs en DOT et négatifs en ELISA, dont 7 confirmés c-ANCA.

### • MBG

La spécificité MBG a été comparée à un test commercial ELISA. L'étude a porté sur 96 échantillons provenant de patients souffrant de syndrome de Goodpasture et sur des échantillons provenant d'individus sains ou atteints d'autres maladies auto-immunes.

| Anti-MBG     |          |               |          |
|--------------|----------|---------------|----------|
|              |          | Méthode ELISA |          |
|              |          | Positifs      | Négatifs |
| ANCA-MBG-DOT | Positifs | 10            | 0        |
|              | Négatifs | 0             | 86*      |

\*: dont un échantillon limite à 20 unités en ELISA

#### Indice de la valeur diagnostique sur la population sélectionnée

|                              |
|------------------------------|
| Sensibilité relative : 100 % |
| Spécificité relative : 100 % |
| Concordance : 100 %          |

## 2. EXACTITUDE

Estimée pour chaque spécificité par un test de recouvrement.

**Principe** : échantillon négatif surchargé par des quantités croissantes d'un échantillon positif.

| Titres ELISA des échantillons positifs |                  |                   |
|--|------------------|-------------------|
| anti-MPO: 84U/ml                       | anti-PR3: 78U/ml | anti-GBM: 170U/ml |

| % sérum négatif | % sérum positif | anti-MPO          | anti-PR3          | Anti-MBG          |
|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 100             | 0               | absence de cercle | absence de cercle | absence de cercle |
| 90              | 10              | halot non cerclé  | halot non cerclé  | halot non cerclé  |
| 80              | 20              | clair cerclé      | clair cerclé      | clair cerclé      |
| 70              | 30              | clair cerclé      | clair cerclé      | clair cerclé      |
| 60              | 40              | clair cerclé      | clair cerclé      | clair cerclé      |
| 50              | 50              | sombre cerclé     | sombre cerclé     | sombre cerclé     |

## 3. REPRODUCTIBILITE

Estimée pour chaque spécificité sur 3 échantillons: positif, douteux ou faiblement positif et négatif

|          | INTRA-ESSAI |   |                   | INTER-ESSAIS |                   |
|----------|-------------|---|-------------------|--------------|-------------------|
|          | Titre       | n | Aspect ANCA-DOT   | n            | Aspect ANCA-DOT   |
| anti-MPO | 84U/ml      | 5 | sombre cerclé     | 5            | sombre cerclé     |
|          | 17U/ml      | 5 | clair cerclé      | 5            | clair cerclé      |
|          | 2U/ml       | 5 | absence de cercle | 5            | absence de cercle |
| anti-PR3 | 78U/ml      | 5 | sombre cerclé     | 5            | sombre cerclé     |
|          | 14U/ml      | 5 | clair cerclé      | 5            | clair cerclé      |
|          | 3U/ml       | 5 | absence de cercle | 5            | absence de spot   |
| Anti-MBG | 290U/ml     | 5 | sombre cerclé     | 5            | sombre cerclé     |
|          | 49U/ml      | 5 | clair cerclé      | 5            | clair cerclé      |
|          | <10U/ml     | 5 | absence de cercle | 5            | absence de cercle |

La comparaison des performances du coffret ANCA-MBG-DOT, nouvelle version (petite bandelette), à celles de l'ancien coffret ANCA-MBG-DOT (bandelette large) montre une concordance de 100% entre les deux versions.

## LISTE DES SYMBOLES

|  |   |
|--|---|
|  | Référence produit                             |
|  | Numéro de lot                                 |
|  | Nombre de tests                               |
|  | Test unitaire                                 |
|  | Pour le diagnostic <i>in vitro</i> uniquement |
|  | Date d'expiration                             |
|  | A conserver entre +2-+30°C                    |
|  | Lire les instructions d'utilisation           |
|  | Conforme à la réglementation CE               |
|  | A reconstituer ou diluer avec de l'eau        |
|  | Contient de l'azide de sodium                 |
|  | Contient du Proclin                           |

## BIBLIOGRAPHIE

- HAGEN EC et al.  
Development and standardization of solid-phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) for clinical application : report of a large clinical evaluation study. Proceedings of the 6th International ANCA Workshop. Paris, 28 June - 1 July 1995. *Clin Exp Immunol*, 101/1: 29, 1995.
- HELLMARK T et al.  
Characterization of anti-GBM antibodies involved in Goodpasture's syndrome. *Kidney Int.* 1994, 46, 823-829.
- HERODY M et al.  
Anti-GBM disease: predictive value of clinical, histological and serological data. *Clin. Nephrol.* 1993, 40, 249-255.
- HUDSON BG et al.  
Molecular characteristics of the Goodpasture autoantigen. *Kidney Int.*, 1993, 43, 135-139.
- HUMBEL RL.  
Néphropathies d'origine immunologique. Autoanticorps et maladies autoimmunes. *Ed. Elsevier* 1994, 171-184.

JENNETTE JC et al.  
Pathogenic potential of anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies. *lab Invest* 70: 135-137, 1994.

JOHANSSON C et al.  
The structural organization of type IV collagen. Identification of three NCI populations in the glomerular basement membrane. *J.Biol. Chem.* 1992, 267, 24533-24537.

KELLY D et al. Goodpasture syndrome: molecular and clinical advances. *Medicine (Baltimore)* 1994, 73, 171-185.

KLEPPEL MM et al. Human tissue distribution of novel basement membrane collagen. *Am. J. Pathol.* 1989, 134, 813-825.

LESAYRE P. et al.  
Les autoanticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA). Signification clinique et rôle pathogène. *Polynucléaire Neutrophile et Biologie Clinique. Hôpital Rotschild PARIS. 7avril 1995.*

NOEL LH et al.  
Les anticorps anticytoplasme des neutrophiles (ANCA): associations cliniques et aspects immunologiques. Grüfeld JP, ed. *Actualités Néphrologiques de l'hôpital Necker. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 223-253, 1992.*

RASMUSSEN N. et al.  
An ELISA for the detection of antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Meth* 127: 139-145, 1990.

SANCHEZ-LALLOYER N.  
Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles. *Spectra Biologie, 93/3: 38-43, 1993.*

SAXENA R et al.  
Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *Intern. Med.* 1995, 237, 143-152.

## SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

|  | OPERATIONS A EFFECTUER   | TEMPS D'INCUBATION       |
|--|--|--------------------------|
| <b>INCUBATION DES SERUMS</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ajouter 20µl d'échantillon dans le tube 1 contenant le tampon TDL.</li> <li>- Y plonger la bandelette identifiée.</li> <li>- Déclencher le chronomètre.</li> <li>- Agiter* manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15s)</li> <li>- Laisser ensuite incuber <u>sans agiter</u>.</li> </ul> | 45 minutes à T.A         |
| Pendant l'incubation des échantillons, distribuer 20µl de conjugué dans le tube 2 contenant le TDL |  |                          |
| <b>LAVAGE</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL.</li> <li>- Agiter* manuellement.</li> <li>- Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant.</li> </ul>   | 1 minute à T.A           |
| <b>INCUBATION DU CONJUGUE</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plonger la bandelette dans le tube 2.</li> <li>- Déclencher le chronomètre.</li> <li>- Agiter* manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15s)</li> <li>- Laisser ensuite incuber <u>sans agiter</u>.</li> </ul>   | 20 minutes à T.A         |
| En fin d'incubation du conjugué, distribuer 1ml de substrat dans le tube 3                         |  |                          |
| <b>LAVAGE</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL.</li> <li>- Agiter* manuellement.</li> <li>- Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant.</li> </ul>   | 1 minute à T.A           |
| <b>INCUBATION DU SUBSTRAT</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Placer la bandelette dans le tube 3.</li> <li>- Déclencher le chronomètre.</li> <li>- Agiter* manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15s)</li> <li>- Laisser ensuite incuber <u>sans agiter</u>.</li> </ul>  | 10 minutes à T.A         |
| <b>LAVAGE</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Laver la bandelette sous l'eau du robinet.</li> </ul>   |                          |
| <b>SECHAGE</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Eliminer l'eau résiduelle en déposant la bandelette sur un papier absorbant et <b>laisser sécher complètement</b> avant l'interprétation du résultat.</li> </ul>  | environ 30 minutes à T.A |

T.A : Température Ambiante entre +18°C et + 25°C.

\* : Les agitations doivent être lentes et verticales.

**BioMédical Diagnostics SA**

**Siège social**

Actipole 25  
4 bld de Beaubourg  
77435 Marne la Vallée Cx2  
France

Tél : 33 1 64 62 10 12  
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : [support@bmd-net.com](mailto:support@bmd-net.com)  
Internet : [www.bmd-net.com](http://www.bmd-net.com)



# ANCA-MBG-DOT

**REF** HM 025



## DEFINITION

The **ANCA-MBG-DOT** kit is a qualitative enzyme immunoassay (EIA) for the simultaneous detection of :

- **anti-neutrophil cytoplasm antibodies** (ANCA) directed against Myeloperoxidase (MPO) and Serine Proteinase 3 (PR3).
- **anti-glomerular basement membrane** (GBM) antibodies using a purified antigen based on type IV

## DIAGNOSTIC VALUE

### • ANCA

ANCA antibodies form a family of autoantibodies for which the diagnostic and predictive value in differentiating necrotising vasculitis and ‘overlap’ systemic vasculitis, associated with glomerulonephritis, is now well established.

The autoantibodies are directed against antigens present in the primary azurophilic granules (alpha granules) of polynuclear neutrophils and in the lysosomes of monocytes.

ANCA antibodies are first detected by means of indirect immunofluorescence using human ethanol-fixed neutrophil slides. The presence of ANCA is characterised in two distinct staining patterns: one cytoplasmic and the other perinuclear.

These two types called c-ANCA and p-ANCA respectively, react predominantly antibodies with proteinase 3 (PR3) and myeloperoxidase (MPO).

The detection of ANCA with Immuno Fluorescent Assay (IFA) only, may result in problems in the differential diagnosis because very similar patterns are created by other autoantibodies. This also holds true in Wegener’s granulomatosis and vasculitis, where the association of ANCA with other autoantibodies is described (rheumatoid factor, antinuclear antibodies, anti-smooth muscle antibodies, anti-thyroid, etc.) as in collagenosis, and autoimmune hepatitis where, in addition to specific autoantibodies, ANCA could also develop.

The diagnostic sensitivity of ANCA is of particular importance with Wegener’s granulomatosis (anti-PR3), Churg Strauss syndrome, microscopic periarteritis and idiopathic crescentic glomerulonephritis (anti-MPO).

These diseases represent a medical emergency and require a safe strategy to identify ANCA in two ways:

- ✦ *By indirect immunofluorescence where two known patterns indicate a general diagnosis.*
- ✦ *A reliable means to differentiate the specificity of the antibodies against the target antigens (MPO and PR3) using specific immunologic techniques and purified antigens.*

### • GBM

The measurement of anti-glomerular basement membrane (GBM) autoantibodies is intended as an aid in the diagnosis of Goodpasture’s syndrome, based on clinical signs of rapidly progressive renal failure and lung haemorrhage. It is an autoimmune disease caused by autoantibodies reacting with the components of the glomerular basement membrane (alpha chain 3 of type IV collagen).

This disease progresses rapidly and in a fatal manner in more than 75% of the cases without treatment. An early diagnosis, based on the presence of the specific marker, anti-GBM autoantibodies is indispensable in minimizing significant damage to the kidney and often the lung. In addition, the continuing presence of these autoantibodies indicates that there should be a delay in renal transplantation.

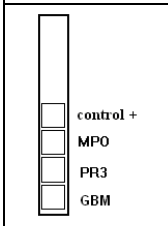
The detection of anti-GBM antibodies allows one to distinguish Goodpasture’s syndrome from other nephropathies of immunologic origin (glomerulonephritis associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) which requires a totally different treatment. A negative result that allows the clinician to rule Goodpasture’s syndrome as a possible diagnosis is very important.

## ASSAY PRINCIPLE

The antigens are coated on distinct membranes on the assay strip.

- First, the assay strip is incubated in a reaction tube containing the diluted sample of the patient. If this sample contains at least one of the antibodies, these antibodies will recognize and bind to the corresponding antigen.
- After incubation, a first wash step removes all of the unbound proteins.
- An alkaline phosphatase labeled protein A conjugate binds to the captured antibodies. The excess of unbound conjugate is removed by a second wash step.
- The bound conjugate is visualised with an insoluble substrate for the phosphatase enzyme (BCIP/NBT). This will give rise to a blue colored circle, confirming the presence of auto-antibodies in the sample tested.

## REAGENTS

|  |   | HM025 |
|--|---|-------|
| Assay strips   |   |       |
|        | <p><i>Antigens coated:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Human purified myeloperoxidase,</li> <li>- Human purified proteinase 3,</li> <li>- Bovine purified “Goodpasture” antigen</li> </ul> <p><b>STRIP</b></p> | 10    |
| 1 vial of PAL Conjugate (Phosphatase alkaline labeled protein A)<br>To dilute              | <b>CONJ</b> <b>IgG</b>  | 300µL |
| 1 vial of Substrate (BCIP/NBT)<br>Ready to use   | <b>SUBS</b> <b>BCIP-NBT</b>   | 12mL  |
| 1 vial of Phosphate-Tween buffer pH 7,2 (concentrated 10x)<br>To dilute in distilled water | <b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>10x</b>   | 30mL  |
| Reaction tubes (1,5mL)   |   | 40    |
| Self-stick labels for returned results   |   | 10    |

## SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

---

- The test is performed on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- If the test is not run immediately, the samples should be stored at +2°C/+8°C for a maximum of 5 days, for longer storage, frozen undiluted samples at -20°C.
- To avoid non-specific binding, it is recommended to centrifuge and filter the cloudy samples or samples frozen for more than 6 months.

## MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

---

- Pipettes
- Timer
- Distilled water (to dilute the concentrated Phosphate-Tween buffer)
- Adsorbent towels (to blot dry the assay strip)
- Support for 96 microtubes (bmd, cat. HM501)

## PRECAUTIONS

---

Be sure that the strips are dry after each wash.

Reagents in solution (except for substrate buffer) contain less of 0.1% (w/v) sodium azide and 0.02% (w/v) of Proclin® 300. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. Azide can form explosive mixtures in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.

**ANCA-MBG-DOT** has been developed according CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labelling of dangerous preparations.

**ANCA-MBG-DOT** has been optimized for the use as describe in this procedure. Do not substitute other manufacturer's reagents. Dilution or adulteration of these reagents may also affect the performance of the test. Close adherence to the test procedure will assure optimal performance.

## STABILITY AND STORAGE

---

- Store reagents and assay strips at +2°C/+8°C in their own package.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- Store unused strips into their plastic bag with the desiccant.
- Store all components immediately after use again at +2°C/+8°C.

## SETUP

---

All reagents must be at room temperature before use.

### 1. Preparation of the wash and dilution buffer

- Dilute 10 times the concentrated Phosphate-Tween buffer in distilled water.
- Storage period: 3 months at +2°C/+8°C

### 2. Preparation of samples

- Mark one strip per sample.
- Mark 3 reaction tubes per sample and number from 1 to 3:
  - ∞ tube 1: sample incubation.
  - ∞ tube 2: conjugate incubation.
  - ∞ tube 3: substrate incubation.
- Dispense 1mL of wash and dilution buffer in tubes 1 and 2.
- Mark another microtube reserved for the two first washing steps and dispenses 1mL of wash and dilution buffer.

### Remarks and precautions:

- ❖ The substrate is light sensitive. It requires to be dispense immediately at the time of his use in the tubes 3.
- ❖ Certain environmental conditions as the temperature may influence the final result. For temperatures > +30°C, it is recommended to be vigilant on the coherence of the results obtained.
- ❖ Certain operational conditions may influence the intensity of the blue color and should therefore be avoided:
  - the agitation time in each wash step is less than a minute
  - the membrane sticking to the wall of the vessel during incubation step.
  - incomplete mixing of sample and conjugate

## INTERPRETATION OF RESULTS

---

### 1. Validation criterion for the manipulation:

- The positive control should give a blue colored circle with a well defined outline.

### 2. Reading of the strips:

In order to interpret correctly make sure that the strips are completely dry.

For each specificity, interpret accordint to this scheme:

| APPEARANCE OF THE WELL   | RESULTS                                 |
|--|---|
| no circle  | absence of auto-antibodies<br>NEGATIVE  |
| presence of a circle of which the staining is variable from bright to dark | presence of auto-antibodies<br>POSITIVE |

*Each membrane showing a difficult to distinguish circle should be controlled with a second blood sample, drawn a few weeks later. The interpretation of the results should be done in relation to other examinations and in the clinical context.*

## QUALITY CONTROL

---

bmd offers an external multiparametric quality control (Immuno-Trol I, Cat: HM036), it contains antibodies directed against ANCA (MPO and PR3 antigens) and GBM. This control should be handled as samples.

## CHARACTERISTICS AND PERFORMANCE OF THE TEST

---

### 1. INDICATION OF THE DIAGNOSTIC VALUE IN COMPARISON WITH AN OTHER METHOD

- ANCA

The MPO and PR3 specificities have been compared with an ELISA on microtiterplates.

The study is based on 172 serum samples of patients suffering of pathologies associated with the presence of ANCA antibodies, healthy individuals and patients suffering of other autoimmune diseases.

All the discordant results between the two methods are been controlled by indirect immunofluorescence.

| Anti-MPO |          |              |          |
|----------|----------|--------------|----------|
|          |          | ELISA method |          |
|          |          | Positive     | Negative |
| ANCA-DOT | Positive | 32           | 1        |
|          | Negative | 0            | 139      |

| Anti-PR3 |          |              |          |
|----------|----------|--------------|----------|
|          |          | ELISA method |          |
|          |          | Positive     | Negative |
| ANCA-DOT | Positive | 20           | 8        |
|          | Negative | 2            | 142      |

#### Anti-MPO

#### Anti-PR3

#### Indication of the diagnostic value for selected samples

Relative sensitivity: 100%

Relative specific affinity: 99%

Concordance: 99%

Relative sensitivity: 91%

Relative specific affinity: 95%

Concordance: 94%

#### Controlled by immunofluorescence

↪ 1 sample positive on the DOT and negative by ELISA. This serum is positive for PR3 on the two methods. It gives p-ANCA and c-ANCA fluorescence pattern.

↪ 2 samples negative on the DOT and positive by ELISA, give a p-ANCA pattern.

↪ 8 samples positive on the DOT and negative by ELISA, 7 give a c-ANCA pattern.

#### • GBM

GBM has been compared with an ELISA on microtiterplates.

The study is based on 96 serum samples of patients suffering of Goodpasture's syndrome, healthy individuals and patients suffering of other autoimmune diseases.

| Anti-GBM |          |              |          |
|----------|----------|--------------|----------|
|          |          | ELISA method |          |
|          |          | Positive     | Negative |
| GBM-DOT  | Positive | 10           | 0        |
|          | Negative | 0            | 86*      |

\*: one sample was on the limit of 20 Units on ELISA

#### Indication of the diagnostic value for selected samples

Relative sensitivity: 100 %

Relative specific affinity: 100 %

Concordance: 100 %

#### 2. ACCURACY

Estimated for each specificity by a test of recoverment :

**Principle:** negative sample with growing quantities of a positive sample.

| Titre of the positive samples |                  |                   |
|-------------------------------|------------------|-------------------|
| anti-MPO: 84U/mL              | anti-PR3: 78U/mL | anti-GBM: 170U/mL |

| % negative sera | % positive sera | anti-MPO         | anti-PR3         | Anti-GBM         |
|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| 100             | 0               | no circle        | no circle        | no circle        |
| 90              | 10              | No circled halot | No circled halot | No circled halot |
| 80              | 20              | Pale circled     | Pale circled     | Pale circled     |
| 70              | 30              | Pale circled     | Pale circled     | Pale circled     |
| 60              | 40              | Pale circled     | Pale circled     | Pale circled     |
| 50              | 50              | Dark circled     | Dark circled     | Dark circled     |

#### 3. REPRODUCIBILITY

Estimated on 3 samples: positive, dubious or weak positive and negative.

|          | INTRA-ASSAY |   |                         | INTER-ASSAY |                         |
|----------|-------------|---|-------------------------|-------------|-------------------------|
|          | Titre       | n | ANCA-GBM-DOT appearance | n           | ANCA-GBM-DOT appearance |
| anti-MPO | 84U/ml      | 5 | dark circle             | 5           | dark circle             |
|          | 17U/ml      | 5 | pale circle             | 5           | pale circle             |
|          | 2U/ml       | 5 | no spot                 | 5           | no spot                 |
| anti-PR3 | 78U/ml      | 5 | dark circle             | 5           | dark circle             |
|          | 14U/ml      | 5 | pale circle             | 5           | pale circle             |
|          | 3U/ml       | 5 | no spot                 | 5           | no spot                 |
| Anti-GBM | 290U/ml     | 5 | dark circle             | 5           | dark circle             |
|          | 49U/ml      | 5 | pale circle             | 5           | pale circle             |
|          | <10U/ml     | 5 | no circle               | 5           | no circle               |

The comparison of the performance GBM-DOT, new version (little strip) to GBM-DOT, previous version (large strip) shows an agreement of 100% between the two versions.

#### SYMBOLS USED

|  |                                |
|--|--------------------------------|
|  | Catalog number                 |
|  | Batch code                     |
|  | Number of tests                |
|  | Rapid test                     |
|  | In vitro diagnostic device     |
|  | Use by                         |
|  | Storage temperature limitation |
|  | Read instructions for use      |
|  | EC Declaration of Conformity   |
|  | Reconstitute with water        |
|  | Contains sodium azide          |
|  | Contains Proclin               |

#### BIBLIOGRAPHY

HAGEN EC et al.

Development and standardization of solid-phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) for clinical application : report of a large clinical evaluation study. Proceedings of the 6th International ANCA Workshop. Paris, 28 june - 1 july 1995. *Clin Exp Immunol*, 101/1: 29, 1995.

HELLMARK T et al.

Characterization of anti-GBM antibodies involved in Goodpasture's syndrome. *Kidney Int.* 1994, 46, 823-829.

HERODY M et al.

Anti-GBM disease: predictive value of clinical, histological and serological data. *Clin. Nephrol.* 1993, 40, 249-255.

HUDSON BG et al.

Molecular characteristics of the Goodpasture autoantigen. *Kidney Int.*, 1993, 43, 135-139.

HUMBEL RL.

Néphropathies d'origine immunologique. Autoanticorps et maladies autoimmunes. *Ed. Elsevier* 1994, 171-184.

JENNETTE JC et al.  
Pathogenic potential of anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies. *lab Invest* 70: 135-137, 1994.

JOHANSSON C et al.  
The structural organization of type IV collagen. Identification of three NC1 populations in the glomerular basement membrane. *J.Biol. Chem.* 1992, 267, 24533-24537.

KELLY D et al. Goodpasture syndrome: molecular and clinical advances. *Medicine (Baltimore)* 1994, 73, 171-185.

KLEPPEL MM et al. Human tissue distribution of novel basement membrane collagen. *Am. J. Pathol.* 1989, 134, 813-825.

LESAVRE P. et al.  
Les autoanticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA). Signification clinique et rôle pathogène. *Polynucléaire Neutrophile et Biologie Clinique. Hôpital Rotschild PARIS.* 7avril 1995.

NOEL LH et al.  
Les anticorps anticytoplasme des neutrophiles (ANCA): associations cliniques et aspects immunologiques. Grùfeld JP, ed. *Actualités Néphrologiques de l'hôpital Necker. Paris: Flammarion Médecine-Sciences,* 223-253, 1992.

RASMUSSEN N. et al.  
An ELISA for the detection of antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Meth* 127: 139-145, 1990.

SANCHEZ-LALLOYER N.  
Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles. *Spectra Biologie,* 93/3: 38-43, 1993.

SAXENA R et al.  
Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *Intern. Med.* 1995, 237, 143-152.

## SUMMARY OF METHOD

|  | OPERATIONS STEPS  | INCUBATION TIME         |
|--|---|-------------------------|
| <b>INCUBATION OF SAMPLES</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Add 20µL sample to tube 1 containing wash and dilution buffer.</li> <li>- Put in the identified strip.</li> <li>- Start the alarm.</li> <li>- Move* the strip manually 20 times up and down (during 15s)</li> <li>- Then incubate <u>without shaking</u>.</li> </ul> | 45 minutes at R.T       |
| During sample incubation, add 20µL conjugate to tube 2 containing wash and dilution buffer |   |                         |
| <b>WASH</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Put the strip in the corresponding wash tube with wash and dilution buffer.</li> <li>- Move* manually.</li> <li>- Take the strip out of the tube and remove residual buffer by blotting the strip with an adsorbent towel.</li> </ul>                                | 1 minute at R.T         |
| <b>INCUBATION OF CONJUGATE</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Put the strip in tube 2.</li> <li>- Start the alarm.</li> <li>- Move* the strip manually 20 times up and down (during 15s)</li> <li>- Then incubate <u>without shaking</u>.</li> </ul>   | 20 minutes at R.T       |
| At the end of the conjugate incubation, dispense 1mL of substrate in tube 3                |   |                         |
| <b>WASH</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Put the strip in the corresponding wash tube with wash and dilution buffer.</li> <li>- Move* manually.</li> <li>- Take the strip out of the tube and remove residual buffer by blotting the strip with an adsorbent towel.</li> </ul>                                | 1 minute at R.T         |
| <b>INCUBATION OF SUBSTRATE</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Put the strip in tube 3.</li> <li>- Start the alarm.</li> <li>- Move* the strip manually 20 times up and down (during 15s)</li> <li>- Then incubate <u>without shaking</u>.</li> </ul>   | 10 minutes at R.T       |
| <b>WASH</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Wash the strip under tap water.</li> </ul>   |                         |
| <b>DRY</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Remove water by blotting the strip with an adsorbent towel and <b>let dry completely</b> before reading the result.</li> </ul>   | about 30 minutes at R.T |

R.T : Room Temperature between +18°C and + 25°C.

\* : Up and down agitations should be slow.

### BioMédical Diagnostics SA

#### Office

Actipole 25  
4 bld de Beaubourg  
77435 Marne la Vallée Cx2  
France

Tel : 33 1 64 62 10 12  
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : [support@bmd-net.com](mailto:support@bmd-net.com)  
Internet : [www.bmd-net.com](http://www.bmd-net.com)

