

Souprava Rheumatoid Factor Screen (GD06) (96 testů)

kvantitativní test pro revmatoidní faktor IgG, IgA a IgM

Souprava Rheumatoid Factor IgM ELISA (GD23) (96 testů)

kvantitativní test pro revmatoidní faktor IgM

Souprava Rheumatoid Factor IgA ELISA (GD24) (96 testů)

kvantitativní test pro revmatoidní faktor IgA

Souprava Rheumatoid Factor IgG ELISA (GD37) (96 testů)

kvantitativní test pro protilátky revmatoidní faktor IgG v krevním séru

Pouze pro diagnostické použití *in vitro*

2001-10-29

1. Použití

Soupravy „Rheumatoid factor ELISA“ představují rychlou metodu detekce celkového nebo specifického revmatoidního faktoru. Slouží jako podpora při diagnostikování revmatických onemocnění. Součástí této sady jsou určeny pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

2. Vysvětlení principu testu

Revmatoidní faktory (RF) jsou protilátky vytvářené proti antigenní části v fc-fragmentu lidského IgG. Zvýšené hladiny revmatoidních faktorů (RF) nacházíme u 70 – 90 % pacientů s revmatickou artritidou (RA) a často i u pacientů s dalšími revmatickými a plicními onemocněními.

Tradiční aglutinační metody měří hlavně protilátky IgM. Pacienti však mohou mít revmatoidní faktory (RF) IgA, IgG nebo IgM, a to buď samostatně, nebo v určitých kombinacích. Zvýšené koncentrace revmatoidního faktoru IgM se vyskytují přibližně u 70 – 80 % pacientů s potvrzenou diagnózou revmatické artritidy, a tyto koncentrace korelují s intenzitou onemocnění a s vaskulitidou. Revmatoidní faktory IgM se považují za rizikový faktor i u normálních jedinců. Revmatoidní faktory IgA mají údajně spojitost s usurací kostí a se symptomy majícími původ v membráně sliznic a v sekrečních orgánech. Řada studií naznačuje, že revmatoidní faktory IgA u časného onemocnění jsou známkou špatné prognózy a opravňují zahájení intenzivnější léčby. Zvýšení hladiny revmatoidních faktorů IgA může předcházet zvýšení koncentrace revmatoidních faktorů IgM v titru. Zvýšené koncentrace revmatoidních faktorů IgG mohou předcházet rozvoji revmatické artritidy (RA) a považují se za rizikový faktor i u normálních jedinců. Zvýšená hladina revmatoidních faktorů IgG se prakticky vztahuje k séru pacientů s RA a s dalšími artritickými onemocněními.

3. Princip testu

Rozředěné vzorky krevního séra se v jamkách na mikrotitrační destičce inkubují s pročištěným králičím imunoglobulinem. Po smytí nenavázaných složek séra se do jamek přidá konjugát peroxidázy s IgA-G-M (GD06), IgM (GD23), IgA (GD24) nebo IgG (GD37) silně reagující s lidskými antigeny. Po inkubaci se nenavázaný konjugát odstraní promytím. Přidá se roztok 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB) / H₂O₂, který v přítomnosti peroxidázy zmodrá. Přidání stop roztoku reakci ukončí a změni modré zbarvení na žluté. Optická hustota standardů, kontrolních vzorků, a testovaných vzorků se měří pomocí readeru Elisa při filtru 450 nm nebo při filtrech 450 a 620 nm. Optická hustota je přímo úměrná aktivitě revmatoidního faktoru ve vzorku.

4. Materiály dodávané v sadě

- Mikrotitrační destička:** 96 jamek na oddělitelných proužcích 12 X 8, pokrytých králičím IgG, s držákem, zabalená v plastovém sáčku s vysoušečem.
- Reagens 1: Roztok pro ředění vzorků:** 62,5 mM; Pufrovaný proteinový roztok; pH 7,2; s antimikrobiálním činidlem; obsah 16 ml, (barva modrá), 16 násobný koncentrát.
- Reagens 2: Promývací pufr:** 150mM; pufrovaný solný roztok s detergentem; pH 7,2; obsah 75 ml; koncentrát (x15).
- Reagens 3: Konjugát:** králíčí s lidskými antigeny silně reagující IgAGM (barva hnědá) nebo IgM (barva zelená) nebo IgA (barva žlutá) IgG (barva červená) konjugovaný v peroxidáze v roztoku stabilizujícím proteiny s antimikrobiálním činidlem; obsah 12 ml, připraven k okamžitému použití.
- Reagens 4: TMB Substrát** vodný roztok TMB a peroxidu vodíku; obsah 12 ml; připraven k okamžitému použití.
- Reagens 5: Stop-roztok** 0,25M kyselina sírová; obsah 12 ml, připraven k okamžitému použití.
- Standardy:** (viz tabulka) 1 ml 10mM pufrovaného solného roztoku obsahujícího lidský revmatoidní faktor, připraveno k okamžitému použití

celkový RF U/ml	IgM-RFIU/ml ¹	IgA-RFU/ml	IgG-RF U/ml
25	25	25	40
50	100	100	100
100	200	200	200
200	400	400	400
500			

1 Kalibrováno pomocí 1st British Rheumatoid Factor Standard 64/2

- Pozitivní kontrolní vzorek:** obsah 1 ml; 10mM pufrovaný solný roztok obsahující lidský revmatoidní faktor; připraven k okamžitému použití.
- Negativní kontrolní vzorek:** obsah 1 ml; 10mM pufrovaný solný roztok obsahující normální lidské krevní sérum, připraveno k okamžitému použití
- Návod k použití**

5. Další zařízení potřebné k provedení testu

- zkumavky na roztoky • kalibrováný odměrný válec pro přípravu promývacího roztoku • přesné pipety a jednorázové špičky pro dávkování 10 µl, 100 µl, 1 ml • promývačka mikrotitračních destiček EIA nebo vícekanálová pipeta nebo promývací láhev • destilovaná nebo deionizovaná voda • savý papír • reader EIA s filtrem 450 nm, případně s referenčním filtrem 620 nm

6. Upozornění**6.1 Bezpečnost**

- Všechny reagenty této soupravy jsou pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Tento test by měl provádět pouze zkušený laboratorní personál. Je nutné striktně dodržovat protokol testu.
- Veškerý materiál lidského původu použitý pro přípravu standardů a kontrolních vzorků, které jsou součástí tohoto výrobku byl otestován na obsah protilátek proti HIV, HbsAg a HCV, a byl shledán negativní. Žádná testovací metoda však nemůže poskytnout úplnou jistotu, že v materiálu není přítomen infekční agens. Proto by se mělo s veškerými reagenty obsahujícími materiál lidského původu zacházet jako s materiály potenciálně infekčními. Pracovníci by měli mít při práci se sérem pacienta, nebo s produkty ze séra vyrobenými, rukavice a ochranný oděv.
- Reagenty této sady obsahují antimikrobiální látky a roztok substrátu obsahuje 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Zabraňte kontaktu s pokožkou a očima. Pokud ke kontaktu dojde, omyjte postižené místo velkým množstvím vody.
- Stop-roztok obsahuje 0,25molární kyselinu sírovou. Zabraňte kontaktu s pokožkou nebo jeho vniknutí do očí. Pokud ke kontaktu dojde, omyjte postižené místo velkým množstvím vody.
- Jakákoli kapalina, která přijde do kontaktu s potenciálně infekčním materiálem, musí být zlikvidována v kontejneru s dezinfekčním prostředkem. Likvidace musí být provedena v souladu s místní legislativou.

6.2 Technické poznámky

- Proužky (stripy) a roztoky by se neměly používat pokud jsou sáčky, ve kterých byly uloženy, porušené, anebo pokud prosakují.
- Před použitím nechejte všechny reagenty a mikrotitrační destičku zahřát na pokojovou teplotu. Zabezpečte, aby byl plastový sáček obsahující nepoužité proužky mikrotitrační destičky dobře uzavřen, a aby v něm bylo vloženo vysoušedlo. Skladujte je při teplotě 2 – 8 °C.
- Při každém testu použijte i pozitivní a negativní kontrolní vzorky, abyste mohli monitorovat stabilitu reagentů a správné provedení testu.
- Přesně dodržujte uvedené doby a teploty inkubace.
- Zajistěte, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi jamkami. Všechny pipety a další zařízení použité pro enzymatický konjugát ukládejte zcela odděleně od reagentu substrátu.
- Při dávkování konjugátu nebo TMB substrátu pipetou by mělo být nabráno takové množství reagentu, aby nebylo nutno špičku pipety opakovaně nořit do ampule s reagentem. Nepoužitý reagens nikdy nevracíte zpět do původních nádob.
- Mezi inkubačními kroky nenechávejte mikrotitrační jamky vyschnout.
- Přesně dodržujte popsany promývací postup. Nedostatečné promytí může způsobit silný falešný signál.
- Během všech inkubačních kroků zabraňte osvětlení destičky přímým slunečním světlem nebo jejím vystavení zdroji tepla.
- Barevné uzávěry nasadte zpět na správné ampule. Zabráňte tím křížové kontaminaci.
- Je důležité dávkovat do jamek všechny vzorky pacienta i všechny kontrolní vzorky bez prodlevy. Proto se před započatím práce ujistěte, že všechny reagenty jsou připraveny k okamžitému použití.

7. Trvanlivost a skladovací podmínky

Po převzetí soupravu skladujte při teplotě 2 – 8 °C. Po otevření jsou látky soupravy stabilní po dobu tří měsíců (nebo do konce expirační doby, pokud je tato kratší než tři měsíce). Nepoužívejte soupravy s prošlou lhůtou expirace. Žádnou část soupravy nezmrazujte. Zředěný promývací roztok uložený v uzavřené láhvi při teplotě 2 - 8 °C má trvanlivost 3 měsíce.

8. Odběr a skladování vzorků

Při dlouhodobém používání a skladování by vzorky séra měly být uloženy při teplotě -20 °C. Po rozmrazení se vzorky musí před testem dobře rozmíchat. Opakované zmrazování a rozmrazování může ovlivnit výsledky testu. Nepříznivý vliv na výsledky může mít i přidání konzervačních látek. Neměly by se používat vzorky mikrobiálně kontaminované, tepelně ošetřené nebo vzorky obsahující pevné částice. Vyhněte se používání silně hemolyzovaných nebo lipemických vzorků.

9. Příprava reagentů

- Rozředte roztok pro ředění vzorků (**Reagens 1**) destilovanou vodou na objem 100 ml.
- Rozředte promývací roztok (**Reagens 2**) v poměru 1:14 destilovanou vodou, abyste měli dost pufu pro provedení celého testu.
- Rozředte vzorky odebrané pacientovi v poměru 1:100 naředěným roztokem pro ředění vzorků (např.: 10 µl séra plus 1ml roztoku).

10. Pracovní postup

- Vyberte počet proužků potřebný pro test.
- Dávkujte 100 µl roztoku na ředění vzorků jako 0 U/ml (nulový standard), Dávkujte 100 µl každého standardu, pozitivního kontrolního vzorku, negativního kontrolního vzorku a rozředěného vzorku pacienta do příslušných jamek.
- Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek a třikrát je promyjte v automatické promývačce mikrotitračních destiček nebo ručním promytím (viz níže). Pečlivě promyťte je klíčem k dobrým výsledkům. Před dalším krokem osušte jamky savým papírem. **Nenechávejte jamky vyschnout.**
Postup pro ruční promývání:
Jamky vyprázdněte tak, že destičku obrátíte. Pomocí vícenásobné pipety nebo promývací láhve jamky naplňte promývacím pufem. Opět jamky vyprázdněte obrácením destičky, a osušte je savým papírem. Tento proces opakujte ještě dvakrát.
- Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagens 3**). Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **15 minut**.
- Po 15 minutách inkubace odsajte obsah jamek, a pečlivě je čtyřikrát promyjte promývacím pufem. Oklepejte destičku na savý papír, abyste odstranili poslední kapky promývací kapaliny.
- Pomocí složené dávkovací pipety rychle do každé jamky dávkujte 100 µl TMB Substrátu (**Reagens 4**). Inkubujte destičku po dobu **15 minut**.
- Do každé jamky přidejte 100 µl Stop-roztoku (**Reagens 5**). Aby byly dodrženy stejné doby reakce, měl by být stop-roztok dávkován do jamek ve stejném sledu jako do nich byl dávkován TMB substrát.
- Po limitu 10 minut odečtěte optickou hustotu (OD) každé jamky readerem s filtrem 450 nm. Jako referenční prostředek lze použít i filtr 620 nm.

11. Zabezpečení kvality

Data pro zabezpečení kvality jsou uvedena na certifikátu šarže, který je přiložen k sadě. Účelem pozitivního kontrolního vzorku je sledování, zda nedošlo k vážnému selhání reagentů.

Každá jamka, která je podle spektrofotometru pozitivní, ale nemá viditelné zabarvení, by se měla z rubu vyčistit, a měla by být znovu změřena. Pokud by byly zjištěny hodnoty nižší než nula, měly by být zkontrolovány použité vlnové délky, reader by měl být znovu nastaven na základní hodnoty a měření by se mělo zopakovat.

12. Interpretace výsledků

Pomocí souřadného systému vyneste do grafu hodnoty optické hustoty každého ze standardů ve vztahu k jejich koncentraci a body spojte ideální křivkou. Z této křivky zjistíte hodnoty neznámých.

Reaktivita	rozsah			
	celkový RF U/ml ¹	IgM RF IU/ml ²	IgA RF U/ml ²	IgG RF U/ml ²
normální	<40	<16	<20	<70
střední	-	16-24	20-30	70-85
pozitivní	>40	>24	>30	>85

¹ Vzorky s hodnotami vyššími než 500 U/ml by měly být otestovány znovu s vyšším naředěním např.: 1:200.

² Vzorky s hodnotami vyššími než 400 U/ml by měly být otestovány znovu s vyšším naředěním např.: 1:200.

13. Limity postupu

- Diagnózu nelze stanovit pouze na základě výsledků testů RF ELISA. Výsledky musí být interpretovány v souvislosti s klinickými nálezy.

- Revmatoidní faktor se může vyskytnout přechodně během mnoha různých infekcí. Pacienti pozitivní na RF by měli být po náležité době opět testováni.

14. Charakteristiky testuKlinické vyhodnocení celkového RF a IgM-RF ELISAPorovnání latexového rozboru a výsledků IgM RF a celkového RF ELISA

vzorek	Latexový titr	IgM RF IU/ml	celkový RF U/ml
1	1:5120	351.8	605.7
2	1:2560	203.0	143.4
3	1:1280	100.3	101.9
4	1:640	45.0	75.0
5	1:320	35.9	48.8
6	1:160	24.2	35.7

Klinické vyhodnocení IgA RF ELISA

Protože aglutinační rozbor detekují především revmatoidní faktor IgM, nelze provést žádnou korelaci mezi aglutinačním testem a testem IgA RF ELISA. Avšak pacienti s časnou artritidou, která se změní na vážnější formu tohoto onemocnění vykazovali při použití testovací metody ELISA zvyšování hladiny IgA RF. Tito pacienti by však byli latexovými testy klasifikováni jako seronegativní.

Klinické vyhodnocení IgG RF ELISA

Agglutinační rozbor detekují především revmatoidní faktor IgM. Proto nelze provést žádnou korelaci mezi těmito testy a testem IgG RF.

15. Reprodukovatelnost

	celkový RF	IgM RF	IgA RF	IgG RF
v rámci sady CV%	6.5	1.3	7.7	7.7
mezi sadami CV%	6.8	11.5	6.9	6.9

Shrnutí postupu

- Zředte sérum roztokem na ředění vzorků (**Reagens 1**) v poměru 1 : 100.
- Do jamek mikrotitrační destičky dávkujte standardy, pozitivní kontrolní vzorek, negativní kontrolní vzorek a zředěný testovaný vzorek.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- Jamky promyjte třikrát.*
- Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagens 3**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **15 minut**.
- Jamky promyjte čtyřikrát.*
- Do každé jamky přidejte 100 µl TMB substrátu (**Reagens 4**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **15 minut**.
- Do každé jamky přidejte 100 µl stop-roztoku (**Reagens 5**).
- Sledujte optickou hustotu s filtrem 450 nm (jediná vlnová délka) nebo 450 nm a 620 nm (dvoji vlnová délka).

Literatura

- Heimer R, Levin FM (1966) On the distribution of rheumatoid factor among the immunoglobulins. *Immunochemistry*, 3, 1-10
- Dunne JV, Carson DA, Speileberg HL, Alspaugh MA & N Vaughan JH (1979) IgA rheumatoid factor in serum and saliva of patients with rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 38, 161-166
- Gioud-Paquet M, Auvinet M, Raffin T, Hazleman BL (1985) IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF IgE RF and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 46, 65 - 71
- Annals of the Rheumatic Diseases*, 1985 44: 14-19
- Annals of the Rheumatic Diseases*, 1984, 43: 673-678 & 679-685.
- Annals of the Rheumatic Diseases*, 1987 46, 380-384.
- Scand J Rheumatology* 1988; Supp. 75: 238-243
- Scand J Rheumatology* 1992; 21: 1-4.
- Annals of the Rheumatic Diseases*, 1992, 51: 863-868.
- The Journal of Rheumatology* 1995 22: 571-572

Kontakty:**Výrobce:****Genesis Diagnostics Ltd.**

Eden Research Park, Henry Crabb Road,
Littleport,
Cambridgeshire, CB6 1SE, United Kingdom
Tel 01353 862220 Fax 01353 863330

Distributor:**LABOSERV s.r.o.**

Hudcova 78b, 612 00 Brno
Tel. 05/41243113, Fax 05/41243114
e-mail laboserv@laboserv.cz